

受理号：CSZ1900042

# 体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：遗传性耳聋基因检测试剂盒

（联合探针锚定聚合测序法）

产品管理类别：第三类 6840

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
产品审评摘要.....	4
一、 产品概述.....	4
二、 临床前研究摘要 .....	6
三、 临床评价摘要 .....	12
四、 风险分析及说明书提示 .....	13
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

# 产品审评摘要

## 一、产品概述

### (一) 产品主要组成成分

表 1 试剂盒主要组成成分

试剂盒组分	装量 1 (768 人份/盒)	装量 2 (3072 人份/盒)	
包装盒 1	PCR 扩增液	5.5mL/支 × 2 支	5.5mL/支 × 8 支
	PCR 反应引物 1-96	20μL/孔 × 96 孔	80μL/孔 × 96 孔
	磷酸化反应液	40μL/支 × 1 支	160μL/支 × 1 支
	磷酸化酶	24μL/支 × 1 支	80μL/支 × 1 支
	连接反应液 1	240μL/支 × 1 支	960μL/支 × 1 支
	连接反应液 2	10μL/支 × 1 支	35μL/支 × 1 支
	连接酶	88μL/支 × 1 支	360μL/支 × 1 支
	标签接头 1-4, 13-16, 25-32, 65-80	8μL/孔 × 32 孔	8μL/孔 × 32 孔
	PCR 反应液	108μL/支 × 1 支	450μL/支 × 1 支
	文库扩增引物	32μL/支 × 1 支	130μL/支 × 1 支
	阳性对照品 1	45μL/支 × 1 支	45μL/支 × 1 支
	阳性对照品 2	45μL/支 × 1 支	45μL/支 × 1 支
	阴性对照品	45μL/支 × 1 支	180μL/支 × 1 支
	DNA 溶解液	520μL/支 × 1 支	2000μL/支 × 1 支
包装盒 2	磁珠	2.3mL/支 × 1 支	4.6mL/支 × 2 支

试剂盒具体组成成分、配套试剂及软件见说明书。

### (二) 产品预期用途

本试剂盒用于体外定性检测干血片样本中人基因组 DNA

的 4 个遗传性耳聋基因的 20 个位点的突变（见表 2），检测结果用于耳聋的辅助诊断，本产品用于构建测序文库。检测结果仅代表对相关位点的检测，不作为患者是否有遗传性耳聋倾向的诊断和排除的唯一标准，如需确诊病例，请结合临床症状及其他检测手段进行综合评估。

表 2 试剂盒检测的遗传性耳聋基因 20 个突变位点信息

突变所在基因	突变所在位点	突变位点描述
GJB2	35	35de1G
	176-191	176_191de116
	235	235de1C
	299-300	299_300de1AT
GJB3	538	538C>T
	547	547G>A
SLC26A4	281	281C>T
	589	589G>A
	1174	1174A>T
	1226	1226G>A
	1229	1229C>T
	1975	1975G>C
	2027	2027T>A
	2162	2162C>T
	2168	2168A>G
	IVS7-2	IVS7-2A>G
	IVS15+5	IVS15+5G>A
线粒体 12S rRNA	1095	1095T>C
	1494	1494C>T
	1555	1555A>G

### （三）产品包装规格

768 人份/盒，3072 人份/盒

### （四）产品检验原理

本试剂盒采用联合探针锚定聚合测序法，根据遗传性耳聋基因突变位点序列信息设计特异性扩增引物，利用多重

PCR 技术扩增人基因组 DNA 中的靶序列并同时引入用于样本识别的样本标签序列。将多个 ( $\leq 96$  个) 样本的 PCR 产物按比例混合成为一个文库样本, 经过一系列文库制备过程, 每个文库样本中的 DNA 序列都加上了用于测序及文库识别的接头序列。将适量文库样本按等物质的量比例混合为一个测序样本。基因测序仪对测序样本进行序列信息读取, 经过文库接头序列及样本标签序列比对拆分, 测序样本中每一条 DNA 的测序结果将被精确定位到每一个样本中。将每个样本的测序结果与人类基因组比对并对 4 个耳聋基因的 20 个突变位点进行数据分析, 从而确定 20 个位点的检测结果。

## 二、临床前研究摘要

### (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 扩增引物、标签接头、文库扩增引物、PCR 扩增液、T4 多聚核苷酸磷酸激酶、连接酶、PCR 反应液、磁珠、“炎黄 1 号”基因组 DNA 样本、野生型质粒和纯合突变型质粒等。野生型质粒和纯合突变型质粒由申请人设计并生产, 其他主要原材料均为外购方式获得。PCR 扩增引物、标签接头和文库扩增引物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、阴性参考品和最低检测限参考品。阳性参考品 9 份，涵盖该产品可检出的所有突变类型。其中，6 份由多种突变类型的重组质粒组成，3 份由含有非稀有突变的临床样本组成；阴性参考品 3 份，由该试剂盒检测范围内变异阴性的临床样本组成；最低检测限参考品 12 份，涵盖该产品可检出的所有突变类型。其中，9 份由阳性参考品稀释而成，3 份由阴性参考品稀释而成。

试剂盒包含 2 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。其中，阳性对照品由重组质粒组成，阴性对照品由“炎黄 1 号”基因组 DNA 组成。

### （二）生产工艺及反应体系研究

申请人通过使用初步确定的配方进行反应体系配置，对反应体系中的 PCR 反应引物用量、PCR 反应引物配比、文库制备起始量、磷酸化酶用量、连接酶用量、标签接头用量、文库扩增体积、PCR 反应液用量、文库扩增引物用量、磁珠用量、文库扩增反应条件等进行筛选和优化，通过功能性试验，最终确定了最佳的反应体系。

### （三）分析性能评估

分析性能评估内容包括核酸提取试剂性能、不同装量试剂盒性能、阳性参考品符合率、阴性参考品符合率、重复性、批间差、最低检测限、分析特异性以及与 Sanger 测序法检

测结果比较等。

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，并根据与该产品的组合性能研究结果，确定“核酸纯化试剂”和“核酸提取试剂”符合检测要求，推荐上述试剂为样本提取用试剂。

针对不同装量试剂盒性能研究，申请人采用临床样本平行比较了两种不同装量试剂盒的阳性符合率、阴性符合率和总符合率。结果显示两种装量试剂盒的阳性符合率、阴性符合率和总符合率均为 100%，证明两种装量试剂盒之间无性能差异。

阳性参考品符合率评估中，申请人分别在三种适配机型（基因测序仪（BGISEQ-500）、基因测序仪（MGISEQ-200）、基因测序仪（MGISEQ-2000））上使用连续生产的三批试剂盒对 9 份企业阳性参考品进行检测，检测结果显示阳性参考品符合率均为 100%。

阴性参考品符合率评估中，申请人分别在三种适配机型（基因测序仪（BGISEQ-500）、基因测序仪（MGISEQ-200）、基因测序仪（MGISEQ-2000））上使用连续生产的三批试剂盒对 3 份企业阴性参考品进行检测，检测结果显示阴性参考品符合率均为 100%。

重复性和批间差评估中，申请人分别在三种适配机型

(基因测序仪 (BGISEQ-500)、基因测序仪 (MGISEQ-200)、基因测序仪 (MGISEQ-2000)) 上使用连续生产的三批试剂盒对 3 份企业阳性参考品和 1 份企业阴性参考品进行 10 次重复检测, 检测结果表明重复性和批间差均满足技术要求规定的性能指标要求。

最低检测限评估中, 申请人设置了四个浓度梯度的人基因组 DNA, 并对每个浓度的 DNA 样本进行了 3 次重复检测, 将具有 100% 检出率的最低浓度设定为预估检测限。在预估检测限浓度附近设置间隔更小的三个浓度梯度, 并对每个浓度的 DNA 样本进行 20 次重复检测, 将具有 100% 检出率的最低浓度水平确定为最低检测限。申请人使用连续生产的三批试剂盒对稀释至最低检测限浓度水平的 9 份企业阳性参考品和 3 份企业阴性参考品进行检测, 检测结果显示检出率、阳性参考品符合率、阴性参考品符合率均为 100%。

分析特异性评估中, 申请人使用试剂盒对分别加入了不同梯度潜在干扰物质 (血红素、甘油三酯和胆红素) 的干扰样本在三种适配机型 (基因测序仪 (BGISEQ-500)、基因测序仪 (MGISEQ-200)、基因测序仪 (MGISEQ-2000)) 上分别进行检测。结果显示当样本中血红素浓度  $\leq 200$  g/L、甘油三酯浓度  $\leq 1000$  mg/dL、胆红素浓度  $\leq 2$  mg/dL 时, 试剂盒检测性能不受影响。申请人使用试剂盒对分别加入了特定浓度 (约合质量浓度  $0.01\text{ng}/\mu\text{L}$ ) 的潜在非人类基因组核酸干

扰物质（大肠埃希氏菌核酸、金黄色葡萄球菌核酸、白色念珠菌核酸）的干扰样本在适配机型（基因测序仪（BGISEQ-500））上进行检测。结果显示样本中存在该浓度的大肠埃希氏菌核酸、金黄色葡萄球菌核酸、白色念珠菌核酸时，试剂盒检测性能不受影响。申请人使用试剂盒对存在检测范围外突变的临床样本在适配机型（基因测序仪（BGISEQ-500））上进行检测。结果显示样本存在检测范围外突变时，试剂盒检测性能不受影响。以上检测结果表明试剂盒具有较好的分析特异性。

与 Sanger 测序法检测结果比较研究中，申请人使用试剂盒对已知 Sanger 测序检测结果的临床样本在三种适配机型（基因测序仪（BGISEQ-500）、基因测序仪（MGISEQ-200）、基因测序仪（MGISEQ-2000））上分别进行检测。检测结果显示试剂盒检测范围内各突变位点的灵敏度、特异性和总符合率均为 100%。

#### （四）阳性判断值

对于 13 个单碱基替换型突变位点（GJB3 基因的 538C>T、547G>A 突变；SLC26A4 基因上的 IVS7-2A>G、2168A>G、1174A>T、1229C>T、1226G>A、1975G>C、2027T>A、2162C>T、281C>T、589G>A、IVS15+5G>A 突变），采用贝叶斯定理计算分析直接得出突变类型。

对于 4 个碱基缺失型位点（GJB2 基因的 35 delG、

176\_191del116、235delC、299\_300delAT) 和 3 个线粒体单碱基替换型突变位点 (线粒体 12S rRNA 基因的 1095T>C、1494C>T、1555A>G 突变), 申请人使用受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, 简称 ROC 曲线) 通过已知检测结果的临床样本确定阳性判断值。

为验证阳性判断值, 申请人使用试剂盒对已知检测结果的临床样本进行检测。检测结果显示阳性符合率、阴性符合率和总符合率均为 100%, 该结果表明建立的阳性判断值能准确判断检测范围内的 20 个突变位点的突变状态。

#### (五) 稳定性研究

为考察遗传性耳聋基因检测试剂盒 (联合探针锚定聚合测序法) 在不同条件 (如温度、反复冻融、开瓶和运输) 下保存时主要性能指标随时间变化的规律, 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, 申请人采用连续生产 3 批遗传性耳聋基因检测试剂盒 (联合探针锚定聚合测序法) 进行稳定性研究, 包括实时稳定性、冻融稳定性、开瓶稳定性和运输稳定性。研究结果表明: 本试剂盒包装盒 1 置于 $-18^{\circ}\text{C}$ 以下保存, 包装盒 2 置于 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存, 有效期为 12 个月; 本试剂盒开瓶后置于相应保存条件下保存 3 个月仍可有效检测; 反复冻融 3 次仍可有效检测。试剂盒包装盒 1 在干冰保护下运输 5 天仍可有效检出, 试剂盒包装盒 2 在冰袋保护下运输 5 天仍可有效检出。

适用样本稳定性研究：为考察干血片样本长时间保存是否会影响试剂盒的检出性能，申请人采用生产的遗传性耳聋基因检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）进行适用样本的稳定性研究，最终确定干血片样本室温干燥条件下可保存3年。

### 三、临床评价摘要

申请人在中山大学附属第五医院、内蒙古自治区妇幼保健院、济宁市第一人民医院共三家临床试验机构开展了临床试验。临床试验采用考核试剂与 Sanger 测序法进行比较研究，验证考核试剂的临床有效性。

考核试剂临床试验共入组 1338 例干血片样本，最终纳入统计分析的有效样本 1293 例。有效样本中共检出 932 例阴性样本、361 例阳性样本。阳性样本中，57 例样本同时存在 2 个位点的突变，2 例样本同时存在 3 个位点的突变，1 例样本同时存在 4 个位点的突变。各突变位点的阳性样本情况如下：35de1G 突变阳性 2 例、176-191de116 突变阳性 13 例、235de1C 突变阳性 145 例、299-300de1AT 突变阳性 47 例、538C>T 突变阳性 6 例、547G>A 突变阳性 3 例、281C>T 突变阳性 6 例、589G>A 突变阳性 4 例、1174A>T 突变阳性 12 例、1226G>A 突变阳性 5 例、1229C>T 突变阳性 1 例、1975G>C 突变阳性 5 例、2027T>A 突变阳性 6 例、2162C>T 突变阳性 3 例、2168A>G 突变阳性 36 例、IVS7-2A>G 突变阳性 106 例、

IVS15+5G>A 突变阳性 2 例、1095T>C 突变阳性 11 例、1494C>T 突变阳性 2 例和 1555A>G 突变阳性 10 例。

与 Sanger 测序法比较研究的结果显示，考核试剂在检测范围内的 20 个突变位点的检测灵敏度均为 100%、特异性均为 100%、总符合率均为 100%；采用 Kappa 进行统计学分析，20 个突变位点的 Kappa 值均为 1。结果表明考核试剂与 Sanger 测序法具有良好的检测一致性。

综上所述，该产品的临床试验对产品的临床性能进行了全面研究，临床试验结果基本符合临床应用要求。

#### **四、风险分析及说明书提示**

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

##### **（一）受益评估**

本试剂盒用于体外定性检测干血片样本中人基因组 DNA 的 4 个遗传性耳聋基因的 20 个位点的突变，检测结果用于耳聋的辅助诊断。近年来临床上采用的听力筛查与基因检测相结合的方法，有助于临床早期发现处于语前听力损失、迟发性或药物致聋型高危患者，并可通过及时干预与治疗降低耳聋高危人群的发病率。

##### **（二）风险评估**

该试剂盒检测结果会受到样本来源、样本采集过程、样本运输条件、样本预处理等样本因素的影响，同时也受到试

验操作、试验环境等试验因素的影响，导致可能得到假阴性或假阳性的检测结果。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，详见产品说明书中【检验方法的局限性】。

不符合该试剂盒说明书中【样本要求】的样本或不恰当的实验操作会导致检测失败或假阴/阳性结果，请严格按照产品说明书中【样本要求】及【检验方法】的要求操作和进行实验过程质控。

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

该试剂盒为基于二代测序平台的多基因位点体外诊断产品，检测过程主要包括干血片样本的人基因组DNA提取、PCR扩增反应、磁珠纯化、文库制备、DNA测序反应及数据分析等步骤。为确保检测全流程的质量得到有效控制，在产品设计开发阶段对涉及的提取试剂、测序试剂，涉及的仪器，涉及的软件进行了全流程匹配性验证，为了确保检测结果的准确性，请使用该试剂盒推荐的配套试剂、仪器及软件进行检测。

### （三）受益-风险确定

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

尽管目前认为该试剂盒的受益大于风险，但是为保证用械安全，基于对主要剩余风险的防控，已在该试剂盒说明书中提示以下信息：

1. 预期用途：本试剂盒用于体外定性检测干血片样本中人基因组 DNA 的 4 个遗传性耳聋基因的 20 个位点的突变，检测结果用于耳聋的辅助诊断。检测结果仅代表对相关位点的检测，不作为患者是否有遗传性耳聋倾向的诊断和排除的唯一标准，如需确诊病例，请结合临床症状及其他检测手段进行综合评估。

2. 警示及注意事项：该试剂盒说明书中明确了该试剂盒检验方法的局限性及使用中的注意事项。

## 综合评价意见

本申报项目为境内第三类医疗器械产品注册，属于优先审批项目。该产品为用于罕见病的体外诊断试剂，申请人的注册申报资料基本符合现行要求，依据《医疗器械监督管理条例》（国务院令第六80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，但申请人需在该产品上市后进一步完成以下工作：鉴于耳聋基因的突变位点属于罕见病，申请人提交的临床试验资料虽然覆盖了全部位点，但个别位点例数偏少，经审评认为该产品满足目前临床使用要求，注册资料符合现行技术审评要求，为了进一步验证产品的检测性能，建议申请人在该产品上市后继续搜集10家临床机构使用该产品的检测数据结果在下一续注册时提交，搜集的数据应包括：1、临床应用数据；2、各基因位点杂合突变、纯合突变的例数。该项临床资料内容应当符合《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》中关于临床试验报告的要求，并由出具数据的各临床机构主管部门签章。

2020年04月16日

附件：产品说明书

# 遗传性耳聋基因检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）说明书

## 【产品名称】

遗传性耳聋基因检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）

## 【包装规格】

768人份/盒，3072人份/盒。

## 【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测干血片样本中人基因组 DNA 的 4 个遗传性耳聋基因的 20 个位点的突变（见表 1），检测结果用于耳聋的辅助诊断，本产品用于构建测序文库。检测结果仅代表对相关位点的检测，不作为患者是否有遗传性耳聋倾向的诊断和排除的唯一标准，如需确诊病例，请结合临床症状及其他检测手段进行综合评估。

表 1 试剂盒检测的遗传性耳聋基因 20 个突变位点信息

突变所在基因	突变所在位点	突变位点描述
GJB2	35	35delG
	176_191	176_191del16
	235	235delC
	299_300	299_300delAT
GJB3	538	538C>T
	547	547G>A
SLC26A4	281	281C>T
	589	589G>A
	1174	1174A>T
	1226	1226G>A
	1229	1229C>T
	1975	1975G>C
	2027	2027T>A
	2162	2162C>T
	2168	2168A>G
	IVS7-2	IVS7-2A>G
	IVS15+5	IVS15+5G>A
线粒体 12S rRNA	1095	1095T>C
	1494	1494C>T
	1555	1555A>G

耳聋是一种普遍高发的听力障碍性疾病。病因复杂，环境因素、遗传因素均可导致耳聋的发生。多数遗传性耳聋是由几个较为常见的热点突变引起，其中中国人群常见的耳聋突变主要包括GJB2、GJB3、SLC26A4以及线粒体的12S rRNA基因突变。GJB2基因定位于

常染色体13q11-q12，编码由266个氨基酸残基组成的缝隙连接蛋白Connexin26，是钾离子循环通路的一部分<sup>[4]</sup>。GJB2基因突变为遗传性耳聋最常见的病因。GJB2基因突变导致的耳聋多为语前、双侧、对称性耳聋，听力损失程度变异较大，可由轻度到极重度，但多数为重度或极重度耳聋<sup>[2,3]</sup>。GJB3基因定位在1p33-p35，编码含有270个氨基酸的缝隙连接蛋白Connexin31。GJB3基因突变可引起常染色体显性或隐性遗传性非综合征性耳聋，被认为与高频听力下降有关<sup>[4]</sup>。SLC26A4基因定位于常染色体7q31区域，编码由780个氨基酸残基组成的多次跨膜蛋白Pendrin，主要与碘/氯离子转运有关，临床上表现为先天性或后天性耳聋，耳聋发生或加重与外伤、感冒有关。同时，SLC26A4基因也是Pendred综合征（先天性耳聋伴甲状腺肿大及前庭功能紊乱）和大前庭水管综合征(EVA)的致病基因<sup>[1]</sup>。线粒体12S rRNA基因突变与氨基糖甙类药物引起的药物性耳聋有关。线粒体12S rRNA基因突变为母系遗传，携带此突变的病患的母系家族成员同样是药物性耳聋敏感个体，接触极小或治疗剂量的氨基糖甙类药物即可诱发严重听力损失。此外，线粒体基因相关的耳聋除药物致聋表型外，也可在无药物接触史的情况下出现成年后听力损失，作为一个单独的非综合征性耳聋类型对待<sup>[5-6]</sup>。近年来临床上采用的听力筛查与基因检测相结合的方法，有助于临床早期发现处于语前听力损失、迟发性或药物致聋型高危患者，并可通过及时干预与治疗降低耳聋高危人群的发病率。

#### 【检验原理】

本试剂盒采用联合探针锚定聚合测序法，根据遗传性耳聋基因突变位点序列信息设计特异性扩增引物，利用多重PCR技术扩增人基因组DNA中的靶序列并同时引入用于样本识别的样本标签序列。将多个（≤96个）样本的PCR产物按比例混合成为一个文库样本，经过一系列文库制备过程，每个文库样本中的DNA序列都加上了用于测序及文库识别的接头序列。将适量文库样本按等物质的量比例混合为一个测序样本。基因测序仪对测序样本进行序列信息读取，经过文库接头序列及样本标签序列比对拆分，测序样本中每一条DNA的测序结果将被精确定位到每一个样本中。将每个样本的测序结果与人类基因组比对并对4个耳聋基因的20个突变位点进行数据分析，从而确定20个位点的检测结果。

【主要组成成分】

表2 试剂盒主要组成成分

试剂盒组分		主要组分	装量 1 (768 人份/盒)	装量 2 (3072 人份/盒)
包装 盒 1	PCR 扩增液	PCR 反应缓冲液、脱氧核糖核苷三磷酸、DNA 聚合酶	5.5mL/支×2 支	5.5mL/支×8 支
	PCR 反应引物 1~96	寡聚脱氧核苷酸	20μL/孔×96 孔	80μL/孔×96 孔
	磷酸化反应液	T4 多聚核苷酸磷酸激酶缓冲液	40μL/支×1 支	160μL/支×1 支
	磷酸化酶	T4 多聚核苷酸磷酸激酶	24μL/支×1 支	80μL/支×1 支
	连接反应液 1	T4 多聚核苷酸磷酸激酶缓冲液、聚乙二醇 8000	240μL/支×1 支	960μL/支×1 支
	连接反应液 2	腺嘌呤核苷三磷酸	10μL/支×1 支	35μL/支×1 支
	连接酶	连接酶	88μL/支×1 支	360μL/支×1 支
	标签接头 1~4,13~16, 25~32,65~80	寡聚脱氧核苷酸	8μL/孔×32 孔	8μL/孔×32 孔
	PCR 反应液	PCR 扩增缓冲液、脱氧核糖核苷三磷酸、DNA 聚合酶	108μL/支×1 支	450μL/支×1 支
	文库扩增引物	寡聚脱氧核苷酸	32μL/支×1 支	130μL/支×1 支
	阳性对照品 1	0.5ng/μL 杂合突变质粒	45μL/支×1 支	45μL/支×1 支
	阳性对照品 2	0.5ng/μL 纯合突变质粒	45μL/支×1 支	45μL/支×1 支
	阴性对照品	2ng/μL 人体细胞基因组 DNA	45μL/支×1 支	180μL/支×1 支
DNA 溶解液	三羟甲基氨基甲烷盐酸盐、乙二胺四乙酸二钠	520μL/支×1 支	2000μL/支×1 支	
包装 盒 2	磁珠	磁珠	2.3mL/支×1 支	4.6mL/支×2 支

注意：不同批次试剂盒内组分严禁混用。

检测所需但未提供的主要设备和材料：

**设备：**台式或掌式离心机、板式离心机、漩涡振荡器、磁力架、ABI-9700 PCR 仪或同等功能的仪器、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）、无核酸酶水、96孔PCR反应板、1.5mL离心管、200 $\mu$ L PCR反应管，封口膜、各类吸头、核酸纯化试剂（医疗器械备案凭证编号：鄂汉械备20150086号，华大生物科技（武汉）有限公司）或核酸提取试剂（医疗器械备案凭证编号：鄂汉械备20180390号，华大生物科技（武汉）有限公司）、测序反应通用试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）（适用机型：BGISEQ-500）（医疗器械备案凭证编号：鄂汉械备20160193号，华大生物科技（武汉）有限公司）、测序反应通用试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）（适用机型：MGISEQ-200）（医疗器械备案凭证编号：鄂汉械备20190039号，武汉华大智造科技有限公司）、测序反应通用试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）（适用机型：MGISEQ-2000）（医疗器械备案凭证编号：鄂汉械备20190039号，武汉华大智造科技有限公司）、遗传性耳聋基因分析软件（医疗器械注册证编号：鄂械注准20192212826，软件版本号：HCS-2 V1.0，HCS-3 V1.0 华大生物科技（武汉）有限公司）。

**【储存条件及有效期】**

本试剂盒包装盒1置于-18 $^{\circ}$ C以下保存，包装盒2置于2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存，有效期均为12个月；生产日期、失效日期见标签。

本试剂盒开瓶后置于相应保存条件下保存3个月仍可有效检测；反复冻融3次仍可有效检测。

**【适用仪器】**

基因测序仪(BGISEQ-500)、基因测序仪(MGISEQ-200)、基因测序仪(MGISEQ-2000)

**【样本要求】**

1. 适用的样本类型

干血片样本。

2. 样本采集

干血片样本采集操作应符合临床血片采集技术规范，采集后的干血片样本自然充分晾干后密封。

3. 样本保存

干血片样本室温干燥下可保存3年。样本保存过程中须保证无污染、无霉变、无受潮，方可使用。

4. 样本安全性

所有样本均视为有潜在的感染性，操作及运输时按国家相关标准执行。

## 【检验方法】

### 一、试剂准备

从试剂盒中取出试剂，将反应液置于冰上融化，振荡混匀，短暂离心备用；酶短暂离心后置于冰上备用；PCR 反应引物 1~96 置于冰上融化，振荡混匀，4000rpm 离心 1 分钟；磁珠在使用前置于室温平衡 30 分钟，加入前应充分混匀；采用无水乙醇及无核酸酶水配制 70% 乙醇，现用现配。

### 二、检测程序

#### 1. 人基因组 DNA 提取

干血片样本建议采用华大生物科技（武汉）有限公司生产的“核酸纯化试剂”（医疗器械备案凭证编号：鄂汉械备 20150086 号）或华大生物科技（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 20180390 号），严格按照说明书操作。

#### 2. PCR 扩增反应

2.1. 根据表 3 的比例在适合的离心管中配制 PCR 扩增反应混合液，混匀后按 18 $\mu$ L 每反应孔分装到 96 孔 PCR 反应板中。上述操作须在冰上进行。

表 3 PCR 扩增反应混合液配方

试剂名称	一个反应标准量
无核酸酶水	5.5 $\mu$ L
PCR 扩增液	12.5 $\mu$ L
总体积	18 $\mu$ L

2.2. 使用八道移液器或自动化移液工作站按顺序吸取 2 $\mu$ L 储存于 96 孔 PCR 反应板中的 PCR 反应引物 1~96，加入到步骤 2.1 的 PCR 反应板的对应孔中，贴上封口膜，置于板式离心机中 4000rpm 离心 1 分钟，取出置于冰上待用。

2.3. 分别取 5 $\mu$ L 的阳性对照品 1、阳性对照品 2 至新离心管中，用无核酸酶水定容至 500 $\mu$ L，充分混匀后瞬时离心。分别向步骤 2.2 的 96 孔 PCR 反应板中加入 5 $\mu$ L 待检测 DNA 样本，每个反应板中至少选择一个反应孔加入 5 $\mu$ L 无核酸酶水作为空白对照（建议随机选择 3 个反应孔设置为 3 个空白对照）。每个反应板中选择两个反应孔分别加入 5 $\mu$ L 阳性对照品 1 和阳性对照品 2 作为阳性对照，每个反应板中选择一个反应孔加入 5 $\mu$ L

阴性对照品作为阴性对照。完成加样后在 PCR 反应板上贴上封口膜，置于板式离心机中 4000rpm 离心 1 分钟。

2.4. 将 PCR 反应板置于 PCR 仪中，运行表 4 的 PCR 反应程序。

表 4 PCR 反应程序

温度	时间	循环数
94℃	2 分钟	1
94℃	20 秒	35
56℃	30 秒	
60℃	20 秒	
72℃	5 分钟	1
12℃	保持	1

2.5. 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。

2.6. 取步骤 2.5 的 PCR 反应板中 PCR 反应产物各 10 $\mu$ L 至 1.5mL 离心管中，振荡混匀后置于台式或掌式离心机离心 5 秒。同一 PCR 反应板中的产物混合到同一离心管中，不同 PCR 反应板中的产物严禁混合。

### 3. 磁珠纯化

3.1. 将室温平衡 30 分钟的磁珠振荡混匀，取 180 $\mu$ L 至 1.5mL 离心管中，加入 100 $\mu$ L 步骤 2.6 的混合样本，混匀后室温静置 10 分钟，磁力架上放置 10 分钟至澄清，弃上清。

3.2. 向离心管加入 350 $\mu$ L 70%乙醇，保证磁珠完全浸入 70%乙醇中，水平 180 度快速转动离心管，静置 1 分钟，使管壁上的磁珠迁移至对面管壁，再次水平 180 度快速转动离心管，静置 1 分钟，弃上清。

3.3. 重复步骤 3.2，打开离心管管盖，室温放置 5 分钟，使乙醇充分挥发。

3.4. 取下离心管，加入 25 $\mu$ L DNA 溶解液，与磁珠充分混匀，室温静置 5 分钟，置于磁力架上至澄清，取上清液至新的 1.5mL 离心管中。

### 4. 文库制备

#### 4.1. 磷酸化反应

4.1.1. 根据表 5 的比例在合适的离心管中配制磷酸化反应混合液，混匀后按 33 $\mu$ L 每反应分装到 200 $\mu$ L PCR 反应管中，上述操作须在冰上进行。

表 5 磷酸化反应混合液配方

试剂名称	一个反应标准量
磷酸化反应液	4 $\mu$ L
磷酸化酶	2 $\mu$ L
无核酸酶水	27 $\mu$ L
总体积	33 $\mu$ L

4.1.2. 取步骤 3.4 的纯化后样本 7 $\mu$ L，加入到步骤 4.1.1 的 200 $\mu$ L PCR 反应管中，混匀，使末端修复反应体系终体积为 40 $\mu$ L。

4.1.3. 将反应管放置 PCR 仪上 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟，结束后置于台式或掌式离心机离心 5 秒，静置于冰上待用，获得文库经磷酸化反应后的磷酸化 DNA。

#### 4.2. 接头连接反应

4.2.1. 根据表 6 的比例在合适的离心管中配制连接反应混合液，混匀后在冰上待用。

表 6 连接反应混合液配方

试剂	一个反应标准量
连接反应液 1	27.2 $\mu$ L
连接反应液 2	0.8 $\mu$ L
连接酶	10 $\mu$ L
总体积	38 $\mu$ L

4.2.2. 如表 7 所示，取步骤 4.2.1 的连接反应混合液 38 $\mu$ L 至步骤 4.1.3 的 200 $\mu$ L PCR 反应管中，再取 2 $\mu$ L 标签接头 X 加入到反应管中（X 表示标签接头 1~4, 13~16, 25~32, 65~80）。每个反应管中只加一种标签接头，同批次检测所用的标签接头不可重复，且须满足步骤 4.4.5 中文库混合时的接头号要求）。

表 7 连接反应体系

试剂	一个反应标准量
磷酸化 DNA	40 $\mu$ L
连接反应混合液	38 $\mu$ L
标签接头 X (1~4,13~16,25~32,65~80)	2 $\mu$ L
总体积	80 $\mu$ L

注意：标签接头在八连管中的排布规则如下图所示：

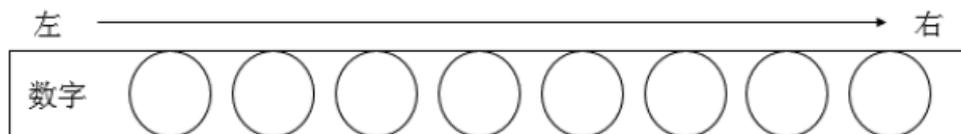


图1 标签接头排列顺序示意图

4.2.3. 务必将步骤 4.2.2 的反应管温和振荡混匀或吹打混匀（至少吹打 25 次），置于台式或掌式离心机中离心 5 秒，并置于 PCR 仪上，关闭热盖 25℃ 孵育 20 分钟。

4.2.4. 反应结束后，将 PCR 反应管置于台式或掌式离心机中离心 5 秒，并将全部反应液转至新的 1.5mL 离心管中。

#### 4.3. 磁珠纯化

4.3.1. 将室温平衡 30 分钟的磁珠振荡混匀，取 72 $\mu$ L 至步骤 4.2.4 的离心管中。混匀、室温静置 10 分钟，磁力架上放置 10 分钟至澄清，弃上清。

4.3.2. 向离心管加入 180 $\mu$ L 70%乙醇，保证磁珠完全浸入 70%乙醇中，水平 180 度快速转动离心管，静置 1 分钟，使管壁上的磁珠迁移至对面管壁，再次水平 180 度快速转动离心管，静置 1 分钟，弃上清。

4.3.3. 重复步骤 4.3.2，打开离心管管盖，室温放置 5 分钟使乙醇充分挥发。

4.3.4. 取出离心管，加入 25 $\mu$ L DNA 溶解液，与磁珠充分混匀，室温静置 5 分钟，置于磁力架上至澄清，取上清液至新的 1.5mL 离心管中。

#### 4.4. 文库扩增

4.4.1. 根据表 8 的比例在适合的离心管中配制 PCR 扩增反应混合液，混匀后按 18 $\mu$ L 每反应分装到 200 $\mu$ L PCR 反应管中，另取步骤 4.3.4 中纯化产物 7 $\mu$ L 加入到反应管中，混匀。上述操作须在冰上进行。

表 8 PCR 扩增反应混合液配方

试剂名称	一个反应标准量
无核酸酶水	2.5 $\mu$ L
PCR 反应液	12.5 $\mu$ L
文库扩增引物	3 $\mu$ L
总体积	18 $\mu$ L

4.4.2. 将 PCR 反应管置于台式或掌式离心机中离心 5 秒钟。将 PCR 反应管置于 PCR 仪中，

运行表 9 的 PCR 反应程序。

表 9 文库扩增反应程序

温度	时间	循环数
95℃	3 分钟	1
98℃	20 秒	10
60℃	15 秒	
72℃	15 秒	
72℃	10 分钟	1
12℃	保持	1

4.4.3. PCR 反应结束后将反应管取出，置于台式或掌上离心机中离心 5 秒钟。

4.4.4. 用安捷伦生物分析仪 2100 或同等功能的仪器检测步骤 4.4.3 中每个文库扩增产物 DNA 片段大小和 DNA 浓度，要求 DNA 片段主峰范围为 240bp~310bp，文库浓度不低于 10ng/μL。

4.4.5. 根据文库浓度结果，将适量的合格文库样本按等物质的量比例混合（推荐加入量以最低浓度文库加 20~24μL 计算，可根据具体文库浓度确定，保证混合后文库的总体积大于或等于 100μL），当混合文库体积不足 100μL 时，加入无核酸酶水补至 100μL。  
**注意：**文库混合数必须为 4 或 8 的倍数，其中标签接头 1~4 为一组，13~16 为一组，25~32 为一组，65~72 为一组，73~80 为一组。每次上机的各标签接头组需整组上机或多组混合上机，如对应接头文库不足时可用其他已检测剩余文库补足或重复建库。

#### 4.5. 磁珠纯化

4.5.1. 将室温平衡 30 分钟的磁珠振荡混匀，取步骤 4.4.5 的混合产物 100μL 到 1.5mL 离心管中，加入 90μL 磁珠混匀。室温静置 10 分钟，磁力架上放置 10 分钟至澄清，弃上清。

4.5.2. 向离心管加入 350μL 70%乙醇，保证磁珠完全浸入 70%乙醇中，水平 180 度快速转动离心管，静置 1 分钟，使管壁上的磁珠迁移至对面管壁，再次水平 180 度快速转动离心管，静置 1 分钟，弃上清。

4.5.3. 重复步骤 4.5.2，打开离心管管盖，室温放置 5 分钟使乙醇充分挥发。

4.5.4. 取出离心管，加入 25μL DNA 溶解液，与磁珠充分混匀，室温静置 5 分钟，置于磁力架上至澄清，取上清液至新的 1.5mL 离心管中。

4.5.5. 用安捷伦生物分析仪 2100 或同等功能的仪器检测步骤 4.5.4 中每个文库扩增产物 DNA 片段大小和 DNA 浓度，要求 DNA 片段主峰范围为 240bp~310bp，计算主峰质量浓度为 M2 ng/μL，浓度应不低于 10ng/μL。

## 5. DNA 测序反应

推荐使用华大生物科技（武汉）有限公司生产的“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 20160193 号）于基因测序仪（BGISEQ-500）上进行测序反应，或使用武汉华大智造科技有限公司生产的“测序反应通用试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）（适用机型：MGISEQ-200）”（医疗器械备案凭证编号：鄂汉械备 20190039 号）于基因测序仪（MGISEQ-200）上进行测序反应，或使用武汉华大智造科技有限公司生产的“测序反应通用试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）（适用机型：MGISEQ-2000）”（医疗器械备案凭证编号：鄂汉械备 20190039 号）于基因测序仪（MGISEQ-2000）上进行测序反应，严格按照说明书操作。

## 6. 数据分析

使用华大生物科技（武汉）有限公司生产的“遗传性耳聋基因分析软件”（医疗器械注册证编号：鄂械注准 20192212826，软件版本号：HCS-2 V1.0，HCS-3 V1.0）进行数据分析，严格按照说明书操作。

## 三、质量控制程序

### 1. 质量控制

每次试验应同时满足阳性对照品 1、阳性对照品 2 及阴性对照品的 299\_300delAT、538C>T、IVS7-2A>G、2162C>T 及 1555A>G 位点检测结果与表 10 中位点信息一致，空白对照检测结果为 nan。否则该文库中样品试验结果视为无效，需重新检测。

表 10 阴、阳性对照品位点信息

突变位点	阳性对照品 1	阳性对照品 2	阴性对照品
299_300delAT	DEL.AT	DEL	AT.AT
538C>T	CT	TT	CC
IVS7-2A>G	AG	GG	AA
2162C>T	CT	TT	CC
1555A>G	AG	GG	AA

### 【阳性判断值】

对于 13 个单碱基替换型突变位点 (GJB3 基因的 538C>T、547G>A 突变; SLC26A4 基因上的 IVS7-2A>G、2168A>G、1174A>T、1229C>T、1226G>A、1975G>C、2027T>A、2162C>T、281C>T、589G>A、IVS15+5G>A 突变), 采用贝叶斯定理计算分析直接得出突变类型。

对于 4 个碱基缺失型位点(GJB2 基因的 35 delG、176\_191del16、235delC、299\_300delAT 突变)和 3 个线粒体单碱基替换型突变位点(线粒体 12S rRNA 基因的 1095T>C、1494C>T、1555A>G 突变), 使用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, 简称 ROC 曲线) 通过已知检测结果的临床样本确定阳性判断值。

为验证阳性判断值, 使用试剂盒对已知检测结果的临床样本进行检测, 检测结果显示阳性符合率、阴性符合率和总符合率均为 100%, 表明建立的阳性判断值能准确判断检测范围内 20 个突变位点的突变状态。

### 【检验结果的解释】

20 个突变位点结果判定见表 11。

以碱基缺失型突变位点 35delG 为例, 35delG 表示 GJB2 基因编码序列的第 35 位的 G 碱基缺失。软件检测结果为 GG 时判断为野生型 (野生型即为正常人群基因型), GDEL 为杂合突变, DEL 为纯合突变;

以单碱基替换型突变位点 538C>T 为例, 538C>T 位点表示 GJB3 基因编码序列的第 538 位的 C 碱基突变为 T。软件检测结果为 CC 时判断为野生型, CT 为杂合突变, TT 为纯合突变。

以线粒体单碱基替换型突变型位点 1494C>T 为例, 1494C>T 位点表示线粒体 12S rRNA 基因编码序列的第 1494 位的 C 碱基突变为 T。软件检测结果为 CC 时判断为野生型, CT 为异质突变, TT 为同质突变。

软件输出样本结果为 nan 时, 判定为未检出, 建议对原有样本进行重新检测。

对于检测突变类型为杂合突变、纯合突变、异质突变和同质突变的样本则表明对应位点存在相应突变, 为相应位点突变阳性, 检测突变类型为野生型的样本则表明对应位点没有突变, 为相应位点突变阴性。

表 11 结果判定

突变位点	检测结果	突变类型	突变位点	检测结果	突变类型
35delG	GG	野生型	1229C>T	CC	野生型
	G.DEL	杂合突变		CT	杂合突变
	DEL	纯合突变		TT	纯合突变
176_191del 16	GCTGCAAG AACGTGTG. GCTGCAAG AACGTGTG	野生型	1975G>C	GG	野生型
	DEL.GCTGC AAGAACGT GTG	杂合突变		GC	杂合突变
	DEL	纯合突变		CC	纯合突变
235delC	CC	野生型	2027T>A	TT	野生型
	DEL.C	杂合突变		TA	杂合突变
	DEL	纯合突变		AA	纯合突变
299_300del AT	AT.AT	野生型	2162C>T	CC	野生型
	DEL.AT	杂合突变		CT	杂合突变
	DEL	纯合突变		TT	纯合突变
538C>T	CC	野生型	2168A>G	AA	野生型
	CT	杂合突变		AG	杂合突变
	TT	纯合突变		GG	纯合突变
547G>A	GG	野生型	IVS7-2A>G	AA	野生型
	GA	杂合突变		AG	杂合突变
	AA	纯合突变		GG	纯合突变
281C>T	CC	野生型	IVS15+5G> A	GG	野生型
	CT	杂合突变		GA	杂合突变
	TT	纯合突变		AA	纯合突变
589G>A	GG	野生型	1095T>C	TT	野生型
	GA	杂合突变		TC	异质突变
	AA	纯合突变		CC	同质突变
1174A>T	AA	野生型	1494C>T	CC	野生型
	AT	杂合突变		CT	异质突变
	TT	纯合突变		TT	同质突变
1226G>A	GG	野生型	1555A>G	AA	野生型
	GA	杂合突变		AG	异质突变
	AA	纯合突变		GG	同质突变

位点未检出的可能原因如下:

1. 样本保存不当，出现霉变、受潮、污染等肉眼可见异常。
2. 操作不当导致扩增失败。

#### 【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检测结果仅供临床医生参考，对受检者临床疾病的诊断应结合其症状、体征、病史以及其他诊断结果等情况综合考虑。
2. 本试剂盒只检测遗传性耳聋基因（包括 GJB2、GJB3、SLC26A4 和线粒体 12S rRNA）的 20 个位点，不可检测与遗传性耳聋疾病相关的其他基因位点。当试剂盒检测结果为野生型时，不排除与遗传性耳聋相关的其他基因位点发生突变。
3. 线粒体基因存在异质性突变的情况，当 1095T>C、1494C>T 和 1555A>G 位点检测结果为野生型时，不排除由于样本突变率低而造成错误的结果。
4. 样本提取交叉污染和 PCR 扩增产物污染，均有可能导致出现假阴性或假阳性结果，试剂盒临床应用必须要有严格的实验分区、实验室管理及质量控制措施。
5. 不合理的样本采集、转运、处理以及不当的试验操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。

#### 【产品性能指标】

##### 1. 准确性

检测 P1~P9 共 9 份企业阳性参考品，结果均与对应参考品的位点突变类型一致。

##### 2. 特异性

检测 N1~N3 共 3 份企业阴性参考品，结果均为检测位点野生型。

检测 30 例存在检测范围外突变的临床剩余干血片样本。结果显示，样本存在检测范围外突变对检测结果没有影响。

##### 3. 重复性

重复检测企业阳性参考品 P2、P4 和 P7 各 10 次，结果均与对应参考品的位点突变类型一致。

重复检测企业阴性参考品 N1 共 10 次，结果均为检测位点野生型。

##### 4. 批间差

使用三个不同批次的试剂盒，分别重复检测企业阳性参考品 P2、P4 和 P7 各 10 次，30 次检测结果均与对应参考品的位点突变类型一致。

使用三个不同批次的试剂盒，分别重复检测企业阴性参考品 N1 各 10 次，30 次检测结

果均为检测位点野生型。

#### 5. 最低检测限

最低检测限不高于 1ng/μL。

将 P1~P9 共 9 份企业阳性参考品及 N1~N3 共 3 份企业阴性参考品分别配制至 1ng/μL 进行检测，均可有效检出并且结果均与对应参考品的位点突变类型一致。

#### 6. 干扰物质

当样本中血红蛋白浓度≤200 g/L、甘油三酯浓度≤1000 mg/dL、胆红素浓度≤2 mg/dL时，试剂盒检测性能不受影响。

当样本中存在大肠埃希氏菌核酸、金黄色葡萄球菌核酸、白色念珠菌核酸（约合质量浓度 0.01ng/μL）时，试剂盒检测性能不受影响。

#### 7. 与 Sanger 测序法检测结果比较

采用遗传性耳聋基因检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）对 323 例干血片样本进行检测，检测结果与已知 Sanger 测序检测结果进行对比。结果显示，遗传性耳聋基因检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）对遗传性耳聋基因 20 个突变位点（35delG、176\_191del16、235delC、299\_300delAT、538C>T、547G>A、281C>T、589G>A、IVS7-2A>G、1226G>A、1174A>T、1229C>T、IVS15+5G>A、1975G>C、2027T>A、2162C>T、2168A>G、1095T>C 1494C>T、1555A>G）的灵敏度、特异性和总符合率均为 100%，Kappa 系数均为 1.00，表明遗传性耳聋基因检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）对遗传性耳聋基因 20 个突变位点的检测结果与 Sanger 检测结果有较好的检测一致性。

#### 8. 临床试验

在3家临床试验机构对 华大生物科技（武汉）有限公司生产的遗传性耳聋基因检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）进行临床试验，符合临床试验方案的入排标准的有效样本 1293 例。

在 1293 例有效样本中，华大生物科技（武汉）有限公司生产的遗传性耳聋基因检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）共检出4个基因20个位点中任意位点阳性的样本 361 例、阴性样本 932 例，对比方法Sanger测序法共检出4个基因20个位点中任意位点阳性的样本 361 例、阴性样本 932 例。

由上述分析结果可知，华大生物科技（武汉）有限公司生产的遗传性耳聋基因检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）对遗传性耳聋4个基因20个位点的检测具有较好的灵敏度、

特异性，与Sanger测序法结果具有较高的总符合率和一致性，验证了遗传性基因检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）对遗传性耳聋4个基因20个位点的检测具有较高的准确性和有效性，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，应按要求使用，使用前试剂应摇匀；
6. 检测中所用的离心管、移液器吸头必须保证无DNase活性；
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. 所有样本和各种废弃物均视为有潜在的污染，应按污染物处理。
9. 检验步骤中配制表均为标准用量，在配制时须考虑损耗。
10. 请严格按照说明书规定的操作步骤进行操作。

#### 【参考文献】

1. 徐百成,郭玉芬,王秋菊.常染色体隐性遗传非综合征性耳聋基因研究进展.中华耳科学杂志,2006,(2):140-145.
2. Denoyelle F, Marlin S, Weil D, et al. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling. Lancet, 1999, 353: 1298-1303.
3. Liu XZ, Pandya A, Angeli S, et al. Audiological features of GJB2 (connexin26) deafness. Ear Hearing, 2005, 26: 361-369.
4. Xia JH, Liu CY, Tang BS, et al. Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. Nat Genet, 1998, 20: 370-373.

5. 赵立东,王秋菊,郭维维等.与线粒体 DNA A1555G 突变有关的非综合征型耳聋[J].中华耳科学杂志,2004(2):136-141.

6. 罕见病诊疗指南(2019 年版)

**【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

邮编：

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】**

**【说明书核准及修改日期】**