

受理号：CSZ2000242

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：人 CYP2C19 基因分型检测试剂盒(飞行
时间质谱法)

产品管理类别：第三类

申请人名称：江苏先声医疗器械有限公司

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	11
四、 产品受益风险判定	12
综合评价意见.....	14

基本信息

一、申请人名称

江苏先声医疗器械有限公司

二、申请人住所

南京市玄武区玄武大道 699-18 号 28 幢

三、生产地址

江苏省南京市玄武区玄武大道 699-18 号 6 幢 1 层和 7 幢 2 层

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

试剂名称	主要成分	规格	数量
PCR 酶	Taq DNA 聚合酶	25 μ L	1 支
10 \times PCR 缓冲液	三羟甲基氨基甲烷盐酸盐、氯化钾、水	60 μ L	1 支
氯化镁溶液	Mg ²⁺ (镁离子)、Cl ⁻ (氯离子)、水	48 μ L	1 支
dNTP 混合物	脱氧核糖核苷酸	12 μ L	1 支
PCR 引物-W1	含有 CYP2C19 636 G>A 位点的一对上下游扩增引物	62 μ L	1 支
PCR 引物-W2	含有 CYP2C19 681G>A 位点的一对上下游扩增引物和 CYP2C19 -806C>T 位点一对上下游扩增引物	62 μ L	1 支
SAP 酶	虾碱性磷酸酶	40 μ L	1 支
SAP 缓冲液	水、氯化镁缓冲液、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐	25 μ L	1 支
延伸反应酶	Pfu DNA 聚合酶	7 μ L	1 支
延伸缓冲液	水、硫酸铵、氯化钾、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐	25 μ L	1 支
延伸终止液	水、乙酰化核糖核苷酸	25 μ L	1 支
延伸引物-W1	含有 CYP2C19 636 G>A 位点的一条延伸引物	62 μ L	1 支
延伸引物-W2	含有 CYP2C19 681G>A 位点的一条延伸引物和 CYP2C19 -806C>T 位点的一条延伸引物	62 μ L	1 支
阳性对照品	CYP2C19 681GG 型质粒、CYP2C19 681AA 型质粒、CYP2C19 636GG 型质粒、CYP2C19 636AA 型质粒、CYP2C19 -806CC 型质粒和 CYP2C19 -806TT 型质粒混合液	25 μ L	1 支
阴性对照品	基因组 DNA	25 μ L	1 支

水	色谱甲醇（HPLC）水	1100 μ L	2 支
---	-------------	-----------------	-----

具体内容详见说明书。

（二）产品预期用途

本产品用于体外定性检测人外周血样本中的 CYP2C19 基因 681 位点 G>A、636 位点 G>A 和 -806 位点 C>T 的多态性。

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

（三）产品包装规格

48 人份/盒。

（四）产品检验原理

本试剂盒采用了多重 PCR 扩增技术、单碱基延伸技术及飞行时间质谱检测技术。根据所选择的多态性位点设计多重 PCR 特异性扩增引物和延伸引物，PCR 扩增包含多态性位点的基因序列，特异延伸引物在 SNP 位点上延伸 1 个碱基，单碱基延伸产物经特定处理后与芯片基质共结晶，瞬时（10-9s）强激光激发，基质将吸收的激光脉冲能量转移给待测样本，在飞行时间质谱检测系统中按质荷比加以分离。离子捕获仪收集并储存脉冲信号，自动对其进行质谱分析。在确定的分子量范围（理论分子量 \pm 5Da）自动进行信噪比（SNR）值分

析并通过 SNR 值的阳性判断值来判断待测样本的基因型。

二、临床前研究概述

(一) 主要原材料

1. 主要原材料的选择

本产品主要原材料包括：PCR Enzyme、10 × PCR Buffer、MgCl₂、25mM、dNTP Mix、Shrimp Alkaline Phosphatase、SAP Buffer、iPLEX Pro Enzyme、Buffer Plus (10 ×)、384 Termination Mix、引物、质粒、gDNA。主要原材料均为外购，引物、质粒由申请人自行设计，由专业的合成公司合成。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

申请人设计了完整的企业参考品，包括：8 份基因型参考品，4 份阴性参考品，5 份检出限参考品，3 份精密度参考品。参考品采用临床样本和质粒样本制备而成。

8 份基因型参考品中 7 份来源于不同基因型的临床样本，1 份来源于质粒样本。4 份阴性参考品中 1 份来源于临床样本，其余 3 份为各包含了 CYP2C19*7/10、CYP2C9*2、CYP2C9*3 序列的混合质粒样本。5 份检出限参考品中 4 份来源于不同基因型的临床样本，1 份来源于质粒样本。3 份精密度参考品均来源于不同基因型的临床样本。所有参考品原材料均通过一代测序确认基因型。各项企业参考品综合用于产品检测准确性、精密度和检出限的评价。

试剂盒包含 1 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。阴性对照品为人 gDNA，阳性对照品为质粒，阳性对照品涵盖该产品可检出的 3 个代表性的突变类型，阴性对照品为野生型样本。

（二）生产工艺及反应体系研究

申请人通过功能性试验确定最佳的生产工艺及反应体系，包括：PCR 扩增反应体系中 PCR 引物、dNTP、PCR 酶的用量，PCR 退火温度、PCR 循环数；酶解反应体系中 SAP 酶的用量，酶解时间；延伸反应体系中延伸引物、延伸终止液、延伸反应酶的用量，延伸反应温度、循环数。同时通过临床样本确定了最优提取试剂盒、最佳 DNA 上样量和 DNA 纯度，确定了配套的树脂芯片，确定了飞行时间质谱检测系统最佳的检测参数，确定了最大检测量及避免交叉污染的方式。

（三）分析性能评估

本产品分析性能包括准确度、检出限、检测上限、精密度、分析特异性（干扰实验、交叉反应）、适用的抗凝剂。申请人提交了六批产品在适用机型上的性能评估资料。

采用 8 份基因型参考品，4 份阴性参考品，5 份检出限参考品，3 份精密度参考品对本产品进行检验，结果均符合要求。

在准确度研究中，申请人采用本产品与 Sanger 测序进行比较研究试验，使用至少三批试剂盒检测 29 份不同浓度

(15-60ng/μL) 的临床样本, 临床样本包含野生型和所有多态性位点的杂合突变、纯合突变。结果显示两种检测方法的符合率为 100%, 表明两种方法具有较好的一致性。

在检出限研究中, 申请人使用至少三批试剂盒进行评估。采用 5 例临床样本, 分别进行梯度稀释, 对系列浓度样本分别进行 3 次重复检测, 初步选择 15ng/μL 和 20ng/μL 作为进一步研究的浓度。采用 5 例临床样本, 分别稀释至 15ng/μL 和 20ng/μL, 对此浓度样本分别进行 20 次重复检测, 以阳性检出率 ≥ 95% 的最低基因组浓度作为检出限, 最终确定该产品检出限浓度为 15ng/μL。在检测上限评估中, 申请人使用至少三批试剂盒进行评估。申请人从 62 例临床样本中选取浓度最高的 5 例临床样本分别进行 3 次重复检测, 检测符合率为 100% 的最高的两个浓度梯度再分别进行 20 次重复检测。结果显示上样浓度高达 388ng/μL, 申报试剂盒仍能准确检出, 未出现非特异的结果。

在精密度研究中, 申请人采用 5 份临床样本分别稀释为检出限浓度和中浓度, 分别评价了本产品批内、批间、检测轮次内(日内)、检测轮次间(日间)、仪器、地点、操作者; 提取试剂盒批内、批间等连续 21 天的精密度, 结果显示检测结果符合率均为 100%。本产品批内、批间、日内、日间精密度, 提取试剂盒批内、批间精密度以及不同操作者、不同地点、不同仪器之间的精密度均较好, 试剂性能稳定。

在干扰研究中，申请人使用至少三批试剂盒对各种可能的内源性及外源性干扰物质进行评价。结果显示：血液样本中可能存在的内源性干扰物质血红蛋白、甘油三酯、胆红素、白蛋白浓度分别为 200g/L、37 mmol/L、342 μ mol/L、60g/L 时对本试剂不产生干扰。外源性干扰物质 EDTA-Na₂、EDTA-K₂、氯吡格雷、替格瑞洛、阿司匹林，浓度分别为 25 mmol/L、2.2mg/mL、300ng/mL、627ng/mL、300ng/mL 时对本试剂不产生干扰。

在交叉反应研究中，申请人使用至少三批试剂盒对临床样本、混合大肠杆菌 DNA 的临床样本、以及具有 CYP2C19 的其他突变序列、CYP2C9 基因序列等同源序列的多份混合样本进行检测，检测结果均与 Sanger 测序结果一致，符合率 100%。结果显示检测靶点之间不产生交叉反应，上述外源 DNA、同源序列与检测靶点之间均不产生交叉反应。

在适用的抗凝剂研究中，申请人采用 27 份临床样本进行三种抗凝剂采血管的适用性研究。结果显示 EDTA 抗凝剂采血管为最佳选择。

（四）阳性判断值研究

申请人采用已知基因检测结果的 99 份样本通过 ROC 曲线分析获得阳性判断值为 $SNR \geq 5$ 。之后采用 132 例临床样本进行阳性判断值适用性的验证，结果显示检测结果与 Sanger 测序结果符合率为 100%。因此阳性判断值设置合理。

（五）稳定性研究

申请人使用三批试剂盒对本产品在实际储存条件下保存至成品有效期后的效期稳定性、开瓶稳定性、反复冻融稳定性、运输稳定性、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，反复冻融次数，样本保存温度和时间。

效期稳定性：申请人采用三批次试剂储存于 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下，分别在 0、1、3、5、7、9、12、14 个月进行外观检查、基因型参考品符合率、检出限和精密度检测，确定试剂在 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下，可稳定保存 12 个月。

开瓶稳定性：申请人采用一批试剂在室温下融化，试剂充分融化后，开盖 10 min，然后盖好试剂， $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下储存。分别在 0、1、2、3、4.5、5.5 和 6.5 个月的时间点取出，进行外观检查、基因型参考品符合率、检出限和精密度检测，确定试剂开瓶稳定性在 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下，可稳定保存 6 个月。

反复冻融稳定性：申请人采用一批试剂进行反复冻融，分别在冻融次数 1、2、3、4、5、6 次时，进行外观检查、基因型参考品符合率、检出限和精密度检测，确定试剂盒在使用过程中可反复冻融 5 次。

运输稳定性：申请人采用一批试剂进行不同路线冷链往返运输，最终确定试剂盒的运输要求为采用保温箱运输（ -20

$\pm 5^{\circ}\text{C}$), 运输时间不超过 3.5 天。

样本稳定性: 申请人采用 20 份临床样本在 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 下保存 0、2、3、4.5、5.5、6.5 个月时, 分别进行检测; 采用 4 份临床样本在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 下保存 0、2、4、7、9 天时, 分别进行检测。检测结果与 Sanger 测序结果进行比对, 结果显示样本在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 可保存一周, $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 可保存 6 个月。

三、临床评价概述

申请人在郑州大学第一附属医院、南京市第一医院、北京大学第一医院和新疆医科大学第一附属医院共 4 家机构完成了临床试验。采用试验体外诊断试剂与已上市同类产品进行对比试验, 确认本产品的临床性能。入组样本为冠心病或正在服用氯吡格雷药物的患者, 共计 1757 例。对于 CYP2C19*2 (rs4244285, c. 681G>A) 位点, GG 基因型 893 例, GA 基因型 716 例, AA 基因型 148 例; 对于 CYP2C19*3 (rs4986893, c. 636G>A) 位点, GG 基因型 1578 例, GA 基因型 172 例, AA 基因型 7 例; 对于 CYP2C19*17 (rs12248560, c. -806C>T) 位点, CC 基因型 1673 例, CT 基因型 80 例, TT 基因型 4 例。试验结果显示, 针对三个基因位点多态性检测, 本产品与对比试剂对每种基因型检测的符合率均为 100%, 总符合率为 100%, 95% 置信区间为 99.78%~100%。综上所述, 临床试验结果显示本产品与已上市同类产品检测一致性良好, 满足技术审评要求。

四、产品受益风险判定

根据“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

根据《YY/T 0316-2016 医疗器械风险管理对医疗器械的应用》及其内部质量管理体系规定执行风险管理相关活动，对该产品进行受益风险判定。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。

(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、样本运输条件等样本因素的影响，同时也受到实验操作、实验环境、试剂储存等试验因素的影响，可能导致数据质量降低或检测失败。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数据质量降低或检测失败，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。

(三) 受益-风险的确定

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。

但为保证用械安全，基于对主要剩余风险的防控，在说明书中提示以下信息：

1. 本产品仅对 CYP2C19 681 G>A、CYP2C19 636 G>A 和 CYP2C19 -806C>T 位点进行了验证。检测结果仅供临床参考，不得作为临床诊治的唯一依据。

2. 本试剂盒仅适用于规定的仪器及检测系统。

3. 若本试剂盒所设计的引物序列区存在其他基因变异，可能导致检测结果异常。

4. 样本的检测方法与样本的收集、处理和保存过程有关。其中任何环节的失误都有可能影响结果的不准确。

综合评价意见

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》（原国家食品药品监督管理局令第 5 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。

2023 年 2 月 27 日

附件：产品说明书

人 CYP2C19 基因分型检测试剂盒(飞行时间质谱法)说明书

【产品名称】

人 CYP2C19 基因分型检测试剂盒(飞行时间质谱法)

【包装规格】

48 人份/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测人外周血样本中的 CYP2C19 基因 681 位点 G>A、636 位点 G>A 和-806 位点 C>T 的多态性。

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

【检验原理】

本试剂盒采用了多重 PCR 扩增技术、单碱基延伸技术及飞行时间质谱检测技术。根据所选择的多态性位点设计多重 PCR 特异性扩增引物和延伸引物，PCR 扩增包含多态性位点的基因序列，特异延伸引物在 SNP 位点上延伸 1 个碱基，单碱基延伸产物经特定处理后与芯片基质共结晶，瞬时（10⁻⁹s）强激光激发，基质将吸收的激光脉冲能量转移给待测样本，在飞行时间质谱检测系统中按质荷比加以分离。离子捕获仪收集并储存脉冲信号，自动对其进行质谱分析。在确定的分子量范围（理论分子量±5 Da）自动进行信噪比（SNR）值分析并通过 SNR 值的阳性判断值来判断待测样本的基因型。

【主要组成成分】

表 1 试剂盒组成

试剂名称	主要成分	规格	数量
PCR 酶	Taq DNA 聚合酶	25μL	1 支
10×PCR 缓冲液	三羟甲基氨基甲烷盐酸盐、氯化钾、水	60μL	1 支
氯化镁溶液	Mg ²⁺ （镁离子）、Cl ⁻ （氯离子）、水	48μL	1 支
dNTP 混合物	脱氧核糖核苷酸	12μL	1 支
PCR 引物-W1	含有 CYP2C19 636 G>A 位点的一对上下游扩增引物	62μL	1 支
PCR 引物-W2	含有 CYP2C19 681G>A 位点的一对上下游扩增引物和 CYP2C19 -806C>T 位点一对上下游扩增引物	62μL	1 支
SAP 酶	虾碱性磷酸酶	40μL	1 支
SAP 缓冲液	水、氯化镁缓冲液、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐	25μL	1 支
延伸反应酶	Pfu DNA 聚合酶	7μL	1 支
延伸缓冲液	水、硫酸铵、氯化钾、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐	25μL	1 支
延伸终止液	水、乙酰化核糖核苷酸	25μL	1 支
延伸引物-W1	含有 CYP2C19 636 G>A 位点的一条延伸引物	62μL	1 支
延伸引物-W2	含有 CYP2C19 681G>A 位点的一条延伸引物	62μL	1 支

	引物和 CYP2C19 -806C>T 位点的一条延伸引物		
阳性对照品	CYP2C19 681GG 型质粒、CYP2C19 681AA 型质粒、CYP2C19 636GG 型质粒、CYP2C19 636AA 型质粒、CYP2C19 -806CC 型质粒和 CYP2C19 -806TT 型质粒混合液	25 μ L	1 支
阴性对照品	基因组 DNA	25 μ L	1 支
水	色谱甲醇 (HPLC) 水	1100 μ L	2 支

注:

- 1) 不同批号试剂盒内各组分不可以互换使用。
- 2) 需自备的试剂: 树脂 (货号: 8060, 基纳生物技术 (上海) 有限公司), 核酸提取或纯化试剂盒 (医疗器械备案号: 粤穗械备 20150062, 货号: IVD3101, 广州美基生物科技有限公司), 无核酸酶水 (货号: AM9937, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司)。
- 3) 需自备的耗材: 384 孔板 (不限厂家, 单次使用), 封板膜 (不限厂家), 质谱芯片 (货号 10500D, 基纳生物技术 (上海) 有限公司), 各种规格带滤芯吸头 (不限厂家), 一次性手套 (不限厂家), 一次性口罩 (不限厂家) 等。

【储存条件及有效期】

置于 -20 \pm 5 $^{\circ}$ C 条件下储存, 使用期限为 12 个月。

试剂盒在使用时尽量减少冻融次数, 冻融次数不超过 5 次。

“生产日期”和“失效日期”详见试剂盒标签。

【适用仪器】

飞行时间质谱检测系统 (型号: SDx MassARRAY, 苏械注准 20202220850); PCR 扩增仪。

【样本要求】

1. 适用于 EDTA 抗凝的全血; 样本在 2~8 $^{\circ}$ C 可保存一周, 如需长期保存请于 -20 \pm 5 $^{\circ}$ C 保存, 效期 6 个月, 避免反复冻融。
2. 从低温取出全血样本需平衡至室温, 提取后的 DNA 样本进行紫外分光光度计测定浓度和纯度, 要求 DNA 检测浓度 \geq 15ng/ μ L (推荐检测浓度为 15-60ng/ μ L), 纯度 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 要求 1.7-2.1 之间。推荐使用广州美基生物科技有限公司核酸提取或纯化试剂盒 (备案号: 粤穗械备 20150062) 用于血液基因组 DNA 的提取。
3. 提取完的 DNA 样本建议立即进行检测, 否则请于 -20 \pm 5 $^{\circ}$ C 保存, 可保存 6 个月, 避免反复冻融。

【检验方法】

1. DNA 样本提取

1) 全血样本 DNA 提取按照核酸提取或纯化试剂盒说明书进行操作, 提取的 DNA 样本建议立即进行检测, 否则置于 -20 \pm 5 $^{\circ}$ C 保存, 备用。

2) 自备无核酸酶水并参与核酸提取过程, 标记为空白对照。

2. PCR 扩增反应

1) PCR 扩增反应体系配制 (CYP2C19 636G>A 位点在 W1 中检测; CYP2C19 681G>A 位点和 CYP2C19 -806C>T 位点在 W2 中检测)

a) 将表 2 中所需试剂取出, 组分 PCR 酶放在冰盒上, 其余组分室温解冻后置于冰盒上待用, 使用前震荡混匀 3~5s, 瞬时离心。根据检测样本数目 (包括阳性对照品、阴性对照品和空白对照), 按表 2 配制 PCR 扩增反应体系, DNA 模板除外 (各组分在配制过程中需多配制所需总量的 20% 损耗量)。

表 2 PCR 扩增反应体系配制

组分	PCR 扩增反应 W1 (μ L) / 反应	PCR 扩增反应 W2 (μ L) / 反应
水	0.8	0.8
10 \times PCR 缓冲液	0.5	0.5
氯化镁溶液	0.4	0.4
dNTP 混合物	0.1	0.1
PCR 引物-W1	1	/
PCR 引物-W2	/	1

PCR 酶	0.2	0.2
DNA 模板	2	2
反应体系总量	5	5

b) 配制完成后, 将剩余试剂放回至 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存, 配制获得 PCR 扩增反应体系 W1 和 PCR 扩增反应体系 W2, 置于冰盒上待用。使用前震荡混匀 30s, 瞬时离心。

2) 加样

a) 将 PCR 扩增反应体系 W1 和 PCR 扩增反应体系 W2 分别按 $3\mu\text{L}$ /孔的量加入 384 孔板反应孔内, 并记录好位置。

b) 将 DNA 模板按照 $2\mu\text{L}$ /孔分别加入相应的 384 孔板反应孔内(一个模板分别对应一个 W1 溶液反应孔和一个 W2 溶液反应孔)。用封板膜将 384 孔板封住; 震荡混匀 30s, 3000 rpm 离心 30s。将管壁上的液体全部甩至管底, 如有气泡, 轻弹、离心直至气泡去除。

3) PCR 扩增

将 384 孔板放入 PCR 仪进行扩增, 设置反应条件如下:

表 3 PCR 扩增反应条件

温度	时间	循环数
98 °C	2 min	—
98 °C	30s	45 个循环
60 °C	30s	
72 °C	60s	
72 °C	5min	
12 °C	∞	

3. 酶解反应

1) 酶解反应体系配制

将表 4 中所需试剂取出, SAP 酶放在冰盒上, 其余组分室温解冻后置于冰盒上待用, 使用前震荡混匀 3~5s, 瞬时离心。根据检测数量, 按表 4 配制酶解反应体系(各组分在配制过程中需多配制所需总量的 20% 损耗量)。配制结束后, 将剩余试剂放回至 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存。酶解反应体系置于冰盒上待用。使用前震荡混匀 30s, 瞬时离心。

表 4 酶解反应体系配制

组分	反应用量 (μL) /反应
水	1.53
SAP 缓冲液	0.17
SAP 酶	0.3
反应体系总量	2

2) 添加酶解反应体系

取出完成扩增反应的 384 孔板, 3000 rpm 离心 30s, 小心撕去 384 孔板的封板膜, 将酶解反应体系按 $2\mu\text{L}$ /孔的量加入上述 384 孔板中, 并用新的封板膜将 384 孔板封住, 震荡混匀 30s, 3000 rpm 离心 30s。将管壁上的液体全部甩至管底, 如有气泡, 轻弹、离心直至气泡去除。

注: 撕去 384 孔板的封板膜之前需要离心且撕膜的动作要轻柔, 以免造成 384 孔板震荡, 丢失反应液或造成样本间的污染。

3) 酶解反应

将 384 孔板放入 PCR 仪进行扩增, 设置反应条件如下:

表 5 酶解反应条件

温度	时间
37 °C	40 min
85 °C	5min
12 °C	∞

4. 延伸反应

1) 延伸反应体系配制 (CYP2C19 636G>A 位点在 W1 中检测; CYP2C19 681G>A 位点和 CYP2C19 -806C>T 位点在 W2 中检测)

a) 将表 6 中所需试剂取出, 延伸反应酶放在冰盒上, 其余组分室温解冻后置于冰盒上待用, 使用前震荡混匀 3~5s, 瞬时离心。根据检测数量, 按表 6 配制延伸反应体系(各组分在配制过程中需多配制所需总量的 20% 损耗量)。

b) 配制结束后, 将试剂放回到 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存。配制获得延伸反应体系 W1 和延伸反应体系 W2, 置于冰盒上待用。使用前震荡混匀 3-5s, 瞬时离心。

表 6 延伸反应体系配制

组分	延伸反应 W1 (μL) /反应	延伸反应 W2 (μL) /反应
水	0.62	0.62
延伸反应酶	0.04	0.04
延伸缓冲液	0.2	0.2
延伸终止液	0.2	0.2

延伸引物-W1	0.94	/
延伸引物-W2	/	0.94
反应体系总量	2	2

2) 添加延伸试剂

取出完成酶解反应的 384 孔板，3000 rpm 离心 30s，小心撕去 384 孔板的封板膜，分别将延伸反应体系 W1 和延伸反应体系 W2 按 2μL/孔的量加入已结束酶解反应的 384 孔板相应反应孔内，并用新的封板膜将 384 孔板封住；震荡混匀 30s，3000 rpm 离心 30s。将管壁上的液体全部甩至管底，如有气泡，轻弹、离心直至气泡去除。

3) 延伸反应

将384孔板放入PCR仪进行扩增，设置反应条件如下：

表7 延伸反应条件

温度	时间	循环数	循环数
95 °C	30s	—	—
95 °C	5s	—	40 个循环
52 °C	5s	5 个循环	
80 °C	5s		
72 °C	3min	—	
12 °C	∞	—	—

注：在 40 个大的循环内嵌入 5 个小循环，主要目的是降低因错配而导致非特异性延伸产物的合成，同时保证获得足量延伸产物。

5 补水

1) 反应结束后，3000 rpm 离心 30s，将管壁上的液体全部甩至管底。

2) 取出试剂盒内组分水，按 16μL/孔的量加入已结束延伸反应的 384 孔板中，同时换一张新的封板膜将 384 孔板封住，3000rpm 离心 30s。

6. 质谱检测

1) 打开随机软件“SpectroACQUIRE-iPLEX_CPM”界面，查看仪器状态指示灯是否正常；然后点击“芯片托盘进入/退出”图标，托盘退出。小心撕去 384 孔板的封板膜，然后将准备好的 384 孔板及芯片放在托盘内相应位置，之后再次点击“芯片托盘进入/退出”图标，托盘退回。

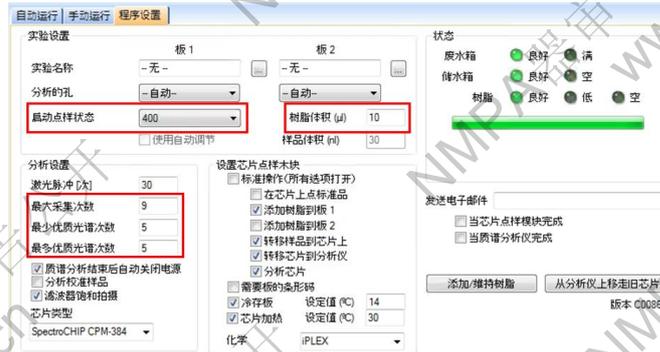
2) 在电脑桌面双击“PlateManager”图标，打开板管理系统软件登陆界面，登陆用户名及密码后进入板管理系统软件界面，该界面主要分为主菜单、板窗格、板布局窗格、板列表窗格、属性窗格五部分。

3) 在板窗格区中选择“样本视窗”选项卡，上传待测样本信息（txt 文本格式）。

4) 在板窗格区中选择“盘浏览器”选项卡，创建实验板；选择“检测项目”选项卡，添加实验项目；选择“样本视窗”选项卡，添加样本信息。

5) 在板管理系统软件界面主菜单区点击“文件”，再点击其下拉菜单“保存”，保存实验板信息；然后再次点击“文件”及其下拉菜单中“输出到质谱采集工作站”，在处理方法选项中选择“Genotype+Area”模式，实验名称内输入本次实验板名称，芯片条形码中输入所用芯片的编号，确定完成输出。

6) 再次选择“SpectroACQUIRE-iPLEX_CPM”软件界面，进行关键参数设置确认：启动点样状态为 400，树脂体积为 10，最大采集次数为 9，最少优质光谱次数为 5，最多优质光谱次数为 5。详细如下图：



仪器参数以及勾选设置详见表 8。

表 8 仪器设置相关参数

	实验名称	选择所编辑的实验计划文件
①实验设置	分析的孔	自动
	启动点样状态	400
	树脂体积(μl)	10
	激光脉冲[次]	30
②分析设置	最大采集次数	9
	最少优质光谱次数	5

	最多优质光谱次数	5
	质谱分析结束后自动关闭电源	<input checked="" type="checkbox"/>
	分析校准样品	<input type="checkbox"/> 不勾选
	滤波器饱和拍摄	<input checked="" type="checkbox"/>
	芯片类型	SpectroCHIP CPM-384
③设置芯片点样模块	标准操作（所有选项打开）	<input type="checkbox"/> 不勾选
	在芯片上点标准品	<input type="checkbox"/> 不勾选
	添加树脂到板位	板1 <input type="checkbox"/> 板2 <input type="checkbox"/> 根据实验板位勾选
	转移样品到芯片上	<input checked="" type="checkbox"/>
	转移芯片到分析仪	<input checked="" type="checkbox"/>
	分析芯片	<input checked="" type="checkbox"/>
	需要板的条形码	<input type="checkbox"/> 不勾选
	冷却板	<input checked="" type="checkbox"/>
	设定值（℃）	14
	芯片加热	<input checked="" type="checkbox"/>
	设定值（℃）	30
	化学	iPLEX

注：③设置芯片点样模块—添加树脂到板位，需根据试验需求勾选。一次检测1张芯片时根据使用的板位勾选板1或板2；一次检测2张芯片时，勾选板1和板2。

7) 完成以上设置后，点击开始按钮“启动芯片制备模块”图标，开始自动化检测流程。

8) 自动化检测流程开始后，检测系统通过以下步骤完成整个流程：

a. 产物纯化：脱盐树脂和延伸产物混合，去除延伸产物中的多余的盐离子。相关参数“树脂体积”。

b. 样本转移：将纯化好的延伸产物转移到芯片对应的基质点上，共结晶。相关参数“启动点样状态”。

c. 激发及检测：对共结晶的产物进行瞬时激光照射，使待测物离子化；离子化的产物通过真空飞行通道，到达检测器。检测器完成对离子产生的脉冲信号的收集，最后通过软件完成分析。相关参数“最大采集次数，最少优质光谱次数，最多优质光谱次数”。

9) 质谱检测结束后，点击“从分析仪上移走旧芯片”，待托盘退出仪器后，取出384孔板和芯片，然后点击“芯片托盘进入/退出”图标，托盘进入仪器。

10) 选择板管理系统软件界面，在主菜单区点击“文件”，再点击其下拉菜单“报告”，选择“CYP2C19基因分析检测报告”，弹出新窗口，勾选本次检测对应芯片编号，然后点击“好”，在后续弹出新窗口中，依次点击“OK”，最后获得本次实验检测报告。

注：

1. 飞行时间质谱检测系统的使用请参考《飞行时间质谱检测系统 SDx MassARRAY 产品使用说明书及维护手册》。

2. 本试剂盒配套的飞行时间质谱检测系统最多可放置2块384孔板和2张芯片，对应的最大检测量是384样本（含对照品）。用户可根据检测需求，选择放置1块384孔板和1张芯片，或2块384孔板和2张芯片。

3. 1张芯片中共有384个基质点，已使用基质点不得重复使用，未使用的基质点仍可使用，未使用完芯片需封闭并在干燥环境下保存，1个月内使用完毕。

4. 质谱仪在定义的目标产物分子量范围（理论分子量 ± 5 Da）自动分析并输出信噪比（SNR）值，然后根据SNR值的阳性判断值来判断待测样本的基因型。

【阳性判断值】

通过对临床样本进行检测分析，以SNR值确认检测结果。

表9 各位点检测结果SNR值判定表

检测位点	SNR值(G)	SNR值(A)	检测结果	产物分子量范围
CYP2C19 681G>A	≥ 5	< 5	GG	G: 6689.4Da ± 5 Da
	≥ 5	≥ 5	GA	G: 6689.4Da ± 5 Da A: 6769.3Da ± 5 Da
	< 5	≥ 5	AA	A: 6769.3Da ± 5 Da

	<5	<5	检测失败	/
检测位点	SNR 值(G)	SNR 值(A)	检测结果	产物分子质量范围
CYP2C19 636G>A	≥5	<5	GG	G: 5135.4Da±5Da
	≥5	≥5	GA	G: 5135.4Da±5Da A: 5215.3Da±5Da
	<5	≥5	AA	A: 5215.3Da±5Da
	<5	<5	检测失败	/
检测位点	SNR 值(C)	SNR 值(T)	检测结果	产物分子质量范围
CYP2C19 -806C>T	≥5	<5	CC	C: 7587Da±5Da
	≥5	≥5	CT	C: 7587Da±5Da T: 7666.9Da±5Da
	<5	≥5	TT	T: 7666.9Da±5Da
	<5	<5	检测失败	/

注：SNR（signal to noise ratio）值代表信噪比；分子质量范围已整合在仪器随机软件中，不在报告中显示。

【检验结果的解释】

1. 试剂盒有效性判定

1) 阳性对照检测结果:CYP2C19 681G>A 位点, 其中 SNR 值(A) ≥5 和 SNR 值(G) ≥5, 检测结果为 GA 型(在 W2 中检测); CYP2C19 636G>A 位点, 其中 SNR 值(A) ≥5 和 SNR 值(G) ≥5, 检测结果为 GA 型(在 W1 中检测); CYP2C19 -806C>T 位点, 其中 SNR 值(C) ≥5 和 SNR 值(T) ≥5, 检测结果为 CT 型(在 W2 中检测)。

2) 阴性对照检测结果: CYP2C19 681G>A 位点, 其中 SNR 值(A) <5 和 SNR 值(G) ≥5, 检测结果为 GG 型(在 W2 中检测); CYP2C19 636G>A 位点, 其中 SNR 值(A) <5 和 SNR 值(G) ≥5, 检测结果为 GG 型(在 W1 中检测); CYP2C19 -806C>T 位点, 其中 SNR 值(C) ≥5 和 SNR 值(T) <5, 检测结果为 CC 型(在 W2 中检测)。

3) 空白对照检测结果: CYP2C19 681G>A 位点, 其中 SNR 值(A) <5 和 SNR 值(G) <5, 检测结果为检测失败(在 W2 中检测); CYP2C19 636G>A 位点, 其中 SNR 值(A) <5 和 SNR 值(G) <5, 检测结果为检测失败(在 W1 中检测); CYP2C19 -806C>T 位点, 其中 SNR 值(C) <5 和 SNR 值(T) <5, 检测结果为检测失败(在 W2 中检测)。

4) 阴阳性对照品对应各位点产物分子质量范围

表 10 对照品对应各位点产物分子质量范围

对照品名称	位点	型别	分子质量范围
阳性对照品	CYP2C19 681G>A	GA	G: 6689.4Da±5Da A: 6769.3Da±5Da
	CYP2C19	GA	G: 5135.4Da±5Da

	636G>A		A:5215.3Da±5Da
	CYP2C19 -806C>T	CT	C: 7587Da±5Da T: 7666.9±5Da
阴性对照 品	CYP2C19 681G>A	GG	G: 6689.4Da±5Da
	CYP2C19 636G>A	GG	G: 5135.4Da±5Da
	CYP2C19 -806C>T	CC	C: 7587Da±5Da

2. 样本检测结果判定

检测结果的判定依照表 9 进行。

【检验方法的局限性】

1. 本产品仅对 CYP2C19 681G>A、CYP2C19 636G>A 和 CYP2C19 -806C>T 位点进行了验证。检测结果仅供临床参考，不得作为临床诊治的唯一依据。
2. 本试剂盒仅适用于规定的仪器及检测系统。
3. 若本试剂盒所设计的引物序列区存在其他基因变异，可能导致检测结果异常。
4. 样本的检测结果与样本的收集、处理和保存过程有关。其中任何环节的失误都有可能造成结果的不准确。

【产品性能指标】

1. 试剂盒各组分应齐全、完整，液体无渗漏；包装标签文字符号应清晰。
2. 基因型参考品符合率：8 份基因型参考品（P1~P8）检测结果应均为对应基因型别，即基因型参考品符合率为 100%。
3. 检出限：试剂盒检出限为 30ng 基因组 DNA（浓度为：15ng/μL），对 5 份检出限参考品（L1~L5）分别重复检测 3 次，检测结果应均为对应基因型。
4. 精密度：3 份精密度参考品（J1~J3）分别重复检测 10 次，检测结果应均为对应基因型。
5. 阴性参考品符合率：4 份企业阴性参考品（N1~N4）检测结果应均为对应基因型别，即阴性参考品符合率为 100%。
6. 对检测范围内的位点（CYP2C19*2、CYP2C19*3 和 CYP2C19*17）进行交叉反应验证；对同源性序列（CYP2C19*4~CYP2C19*15，CYP2C19_80161G>A；CYP2C9 基因序列的 CYP2C9*2 和 CYP2C9*3）进行交叉反应验证。结果表明试剂盒特异性好，上述验证项目对试剂盒的检测不会产生影响。
7. 分别选择干扰物质血红蛋白、胆红素、甘油三酯、EDTA.Na₂、EDTA.K₂、白蛋白、氯吡格雷、替格瑞洛和阿司匹林进行干扰性评估，研究结果表明上述干扰物质对检测结果无影响。
8. 临床试验结果：与已上市同类产品进行方法学对比研究，检测 CYP2C19 基因多态性，纳入统计的有效样本为 1757 例。与对比方法相比，CYP2C19 基因 681 位点 GG 符合率 100%，GA 符合率 100%，AA 符合率 100%；CYP2C19 基因 636 位点 GG 符合率 100%，GA 符合率 100%，AA 符合率 100%；CYP2C19 基因-806 位点 CC 符合率 100%，CT 符合率 100%，TT 符合率 100%；总符合率 100%。统计结果表明，本试剂盒与同类已上市产品无显著差异。

【注意事项】

1. 本试剂盒用于体外检测，实验前请仔细阅读本说明书，请在有效期内使用。
2. 为防止污染，本试剂盒建议使用一次性耗材和带滤芯吸头。
3. 实验过程中使用的 384 孔板经历了整个实验流程。为防止污染，384 孔板为一次性使用，一次实验未用完，不可再次使用。
4. 所有检测样本、试剂盒中的阴性对照品应视为具有传染性的物质，操作和废弃物处理均需符合相关法规要求：卫生部《微生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。
5. 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，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。
6. 本试剂盒主要组成为 PCR 试剂（DNA 聚合酶、dNTP 及缓冲液等）和对照品（人类基因组 DNA、质粒 DNA）。产品本身不含有毒的化学物质，但不排除潜在的危险性。操作时，需采取合适的防护措施，如穿着合适的实验室工作服、佩戴一次性手套等。产品在使用的过程中若不慎溅入眼中应立即用冲眼器或大量清水冲洗眼睛。
7. PCR 检测应在有资质的临床 PCR 实验室进行，临床实验室应严格按照现行有效版本《医疗机构临床基因扩增实验室管理办法》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。

【参考文献】

[1] Sim, S.C. et al. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants.[J]. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2006, 79(1):103-113.

[2] Rudberg I, Mohebi B, Hermann M, et al. Impact of the ultrarapid CYP2C19*17 allele on serum concentration of escitalopram in psychiatric patients.[J]. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2008, 83:322-327.

[3] Collet J P, Hulot J S, Pena A, et al. Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: A cohort study[J]. Lancet, 2009, 373(9660):309-317.

[4] Zou J J, Xie H G, SL Chen, et al. Influence of CYP2C19 loss-of-function variants on the antiplatelet effects and cardiovascular events in clopidogrel-treated Chinese patients undergoing percutaneous coronary intervention[J]. European Journal of Clinical Pharmacology, 2013, 69(4):771-777.

[5] Sofri F, Giusti B, Marcucci R, et al. Cytochrome P450 2C19*2 polymorphism and cardiovascular recurrences in patients taking clopidogrel: a meta-analysis.[J]. Pharmacogenomics Journal, 2011, 11(3):199-206.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 江苏先声医疗器械有限公司

住所: 南京市玄武区玄武大道 699-18 号 28 幢

联系方式:

售后服务单位名称:

联系方式:

生产地址: 江苏省南京市玄武区玄武大道 699-18 号 6 幢 1 层和 7 幢 2 层

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】