

受理号：CSZ2300345

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：微卫星不稳定性（MSI）检测试剂盒（荧光
PCR-毛细管电泳法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：上海普洛麦格生物产品有限公司

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.....	10
四、 产品受益风险判定.....	12
综合评价意见.....	15

基本信息

一、申请人名称

上海普洛麦格生物产品有限公司

二、申请人住所

上海市闵行区新骏环路 88 号 12 幢 B 栋

三、生产地址

上海市闵行区新骏环路 88 号 12 幢 102 和 202 室、上海市闵行区新骏环路 138 号 3 幢 101 室、上海市闵行区新骏环路 188 号 8 幢 303 室 B 区和 C 区

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

产品主要组成成分见表 1:

表 1 试剂盒主要组成成分

试剂组分名称	规格/管	主要成分
5×微卫星引物	100 μL×1	人工合成寡核苷酸
5×微卫星反应液	100 μL×1	dNTPs, Taq 酶, MgCl ₂ , Tris-HCl
无核酸酶水	1000 μL×1	无核酸酶水
人基因组 DNA(10 ng/μL)	25 μL×1	2800M DNA, Tris-HCl, EDTA
分子量标志物	25 μL×1	核苷酸片段

注：试剂盒各组分应在有效期内使用，不同批次的试剂盒组分不得混用。

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于体外定性检测结直肠癌患者肿瘤组织 FFPE 样本基因组 DNA 中的 8 个微卫星位点(NR-21, BAT-25, BAT-26, Mono-27, BAT-52, BAT-56, BAT-59, BAT-60)，通过与正常对照样本检测结果对比，确定是否发生了微卫星序列长度变化。根据发生序列长度变化的微卫星位点数量，将结直肠癌分为微卫星高度不稳定、微卫星低度不稳定以及微卫星稳定三种微卫

呈状态。

本试剂盒的检测结果显示用于辅助鉴别结直肠癌中可能的林奇综合征患者。

本产品的应用应参考临床相关诊疗指南的要求，检测结果的解读应结合其他临床诊断信息、疾病家族史及实验室检测信息进行综合分析。

本产品尚未进行有关用药指导的临床性能评价。

(三) 产品包装规格

48 测试/盒。

(四) 产品检验原理

本试剂盒基于荧光 PCR-毛细管电泳技术，对 8 个单核苷酸重复微卫星位点 (NR-21, BAT-25, BAT-26, Mono-27, BAT-52, BAT-56, BAT-59, BAT-60) 不稳定性进行分析，同时含有 2 个五核苷酸重复微卫星位点 Penta C 和 Penta D，作为内对照，用于同一样本来源的鉴定，检测潜在的样品混杂或污染。首先分别提取正常组织与癌组织样本的 DNA，使用本试剂盒中的 5 × 微卫星引物和 5 × 微卫星反应液配制成 PCR 反应液，对正常组织与癌组织 DNA 进行 PCR 扩增，用人基因组 DNA (10 ng/μL) 作为阳性扩增对照，用无核酸酶水作为阴性扩增对照，扩增产物和分子量标志物使用 3500Dx 基因分析仪进行电泳，最后使用

GeneMapper®软件进行数据分析，对比正常组织与癌组织的检测结果，判定癌组织样本位点状态。

表 2 检测位点信息表

检测位点	荧光标记
NR-21	FAM
BAT-160	FAM
BAT-25	JOE
BAT-59	JOE
BAT-26	TMR
BAT-56	TMR
MONO-27	ROX
BAT-52	ROX
对照位点 (五核苷酸重复位点)	JOE
	FAM

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、PCR 反应液、人基因组 DNA 和分子量标记物，均通过外购的方式获得。其中引物由申请人自行设计，委托专业的合成公司合成。通过功能性试验，申请人筛选出最佳原材料和生产商，同时制定了各主要原材料质量

标准并经检验合格。

2. 企业参考品设置情况

该产品企业参考品包括阳性参考品、阴性参考品、检测限参考品和重复性参考品，分别由细胞系和临床 FFPE 样本制备而成。

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。此外本试剂盒含有 2 个五核苷酸重复标志物 Penta C 和 Penta D，用于判断肿瘤组织和正常组织是否来源于同一个体，避免因样本混淆造成的误判。

(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 PCR 反应液用量、引物用量、核酸用量的确定；对反应条件的研究包括扩增循环数、扩增温度和时间、毛细管进样时间、分离胶选择、分析软件等的确定；对样本要求、样本用量等进行了研究。通过功能性实验，确定了最佳的反应体系。

申请人根据试剂盒中组分的性能参数研究结果，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主要包括：准确度、精密度、最低检测限、分析特异性等。

准确度研究中，使用 3 批成品试剂盒在适用机型上对阳性参考品和阴性参考品进行检测，检测结果显示阳性参考品符合率、阴性参考品符合率均为 100%。同时使用若干临床样本对试剂盒准确性进行了研究，包括了 MSS、MSI-L、2 个~8 个不稳定位点的不同位点组合类型的 MSI-H 样本，研究结果显示试剂盒检测结果与 Sanger 测序法结果一致。

精密度研究中，申请人采用 MSS、不同浓度水平的 MSI-H 细胞系参考品和临床样本对批内/批间、日内/日间、不同人员间、不同仪器间和实验室间精密度进行评价，其精密度检测结果均一致。

最低检测限研究从肿瘤 DNA 含量和 DNA 加样量两个方面进行评价。采用阴性、阳性细胞系混合样本和结直肠癌 FFPE 样本，采用不同梯度浓度/比例样本进行检测，以 95% 的阳性检出率作为标准，最终确定本试剂最低检出限为在 5ng 基因组 DNA 背景下，对肿瘤 DNA 含量 10% 的检测限参考品进行检测，结果均为微卫星高度不稳定。

分析特异性研究包含野生型耐受性验证、交叉反应研究和干扰研究。采用高浓度野生型核酸样本进行验证，结果显示本试剂盒可以耐受 20ng/ μ L 及以下的野生型 DNA。交叉反应评价中，检测绿脓假单胞菌、金黄色葡萄球菌、肠炎沙氏门菌、大

肠埃希氏菌、白色念珠菌、奇异变形杆菌、屎肠球菌、痢疾志贺氏菌、普通变形杆菌、小鼠 DNA，均未与本产品发生交叉反应。干扰试验结果显示，临床样本中可能存在的潜在干扰物如甘油三酯（37 mM）、血红蛋白（2 mg/mL）、乙醇（5%）、中性福尔马林、石蜡（1%）以及治疗性药物氟尿嘧啶（3 mmol/L）均不干扰本试剂盒的检测结果。

申请人采用临床样本进行了核酸提取试剂盒的性能研究，根据核酸提取物纯度、浓度等，确定了配套使用的核酸提取试剂。

（四）阳性判断值研究

采用结直肠癌临床样本进行阳性判断值研究，包括阳性判断值的确定和验证两个部分，共计入组有效样本数 570 例。采用一定数量的临床样本进行阳性判断值的确定，通过位点位移范围分析、受试者特征（ROC）曲线分析确定试剂盒的阳性判断值，再用另外一批临床样本对阳性判断值进行验证。

最终确定本产品的阳性判断值为：将正常组织与肿瘤组织的每个相应微卫星位点相比，若在待检测样本的肿瘤组织中出现新的等位基因，并且位移超过 3bp，则认为此位点为微卫星不稳定。若 ≥ 2 个微卫星位点表现为不稳定，则判断样本为微卫星高度不稳定性（MSI-H）；若 0 或 1 个微卫星位点表现为不稳定，

则判断样本为微卫星稳定(MSS)或微卫星低度不稳定(MSI-L)。

(五) 稳定性研究

申请人对本产品实时稳定性、运输稳定性、开瓶稳定性、冻融稳定性和样本稳定性进行研究,确定了在各种条件下本产品及样本的有效保存时间。

实时稳定性研究:将3批试剂盒储存于规定储存条件下,分别在0、3、6、9、12、15、18、21、24、25和26个月对阳性参考品符合率、阴性参考品符合率、检测限和重复性进行考察,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,有效期为24个月。

此外,申请人对产品的运输稳定性、开瓶稳定性、冻融稳定性和样本稳定性分别进行了研究。结果显示,产品性能均能满足产品说明书声称。

三、临床评价概述

申请人在南方医科大学南方医院、四川大学华西医院、浙江大学医学院附属第二医院和中日友好医院共4家临床机构完成了临床试验。入组病例均为结直肠癌患者。临床试验包括三部分内容:

第一部分,采用试验用体外诊断试剂与MMR蛋白免疫组化法进行对比试验,共纳入1003例样本,其中MSI-H 319例,

MSI-L/MSS 684 例。试验结果显示，两种方法的阳性符合率为 99.4% (95%CI: 97.7%, 99.8%)，阴性符合率为 98.9% (95%CI: 97.9%, 99.50%)，总符合率为 99.1% (95%CI: 98.3%, 99.5%)。

第二部分，采用试验用体外诊断试剂与结直肠癌中疑似林奇综合征的临床参考标准，即疑似林奇相关基因的胚系致病突变 (NGS 方法) 进行比较研究，共纳入 389 例样本，其中疑似林奇综合征患者样本 75 例，非疑似林奇综合征患者样本 314 例。结果显示：试验体外诊断试剂的灵敏度为 97.3% (95%CI: 90.8%, 99.3%)，特异度为 92.9% (95%CI: 89.6%, 95.3%)。

第三部分，采用试验用体外诊断试剂检测结果与 Sanger 测序检测结果进行比较研究，结果显示：BAT-25 位点的阳性符合率为 100% (95%CI: 96.9%, 100%)，阴性符合率为 100% (95%CI: 96.5%, 100%)；BAT-26 位点的阳性符合率为 100% (95%CI: 97%, 100%)，阴性符合率为 100% (95%CI: 96.5%, 100%)；MONO-27 位点的阳性符合率为 100% (95%CI: 97.8%, 100%)，阴性符合率为 99.2% (95%CI: 95.8%, 99.9%)；NR-21 位点的阳性符合率为 100% (95%CI: 97%, 100%)，阴性符合率为 100% (95%CI: 96.5%, 100%)；BAT-52 位点的阳性符合率为 100% (95%CI: 97.1%, 100%)，阴性符合率为 100% (95%CI: 96.4%, 100%)；BAT-56 位点的阳性符合率为 100% (95%CI: 97.0%, 100%)，阴性符合

率为 99.0% (95%CI: 94.8%, 99.8%) ; BAT-59 位点的阳性符合率为 100% (95%CI: 97.0%, 100%) , 阴性符合率为 100% (95%CI: 96.4%, 100%) ; BAT-60 位点的阳性符合率为 100% (95%CI: 96.9%, 100%) , 阴性符合率为 100% (95%CI: 96.5%, 100%) 。

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临床性能满足要求。

四、产品受益风险判定

(一) 受益评估

中国已成为全球结直肠癌每年新发病例数和死亡病例数最多的国家, 结直肠癌严重影响和威胁我国居民身体健康。林奇综合征占有所有结直肠癌病例的 2% ~ 4% , 这种遗传综合征是由 DNA 错配修复基因的胚系突变引起的。按照现有疾病诊疗流程, 疑似林奇综合征的患者可通过免疫组化方法检测 MMR 蛋白或通过微卫星不稳定性分析进行检测, 以初步确定可能患有林奇综合征的患者, 然后再通过 DNA 错配修复基因 (MMR) 的胚系突变检测对林奇综合征进行确诊。

本试剂盒用于体外定性检测结直肠癌患者肿瘤组织 FFPE 样本基因组 DNA 中的 8 个微卫星位点 (NR-21, BAT-25, BAT-26, Mono-27, BAT-52, BAT-56, BAT-59, BAT-60) , 通过与正常对

照样本检测结果对比，确定是否发生了微卫星序列长度变化。

根据发生序列长度变化的微卫星位点数量，将结直肠癌分为微卫星高度不稳定、微卫星低度不稳定以及微卫星稳定三种微卫星状态。

本试剂盒的检测结果用于辅助鉴别结直肠癌中可能的林奇综合征患者。

本产品的应用应参考临床相关诊疗指南的要求，检测结果的解读应结合其他临床诊断信息、疾病家族史及实验室检测信息进行综合分析。

本产品尚未进行有关用药指导的临床性能评价。

(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，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。

本产品存在假阴性的可能，针对假阴性病例临床上可能延误疾病治疗，说明书中已明确疾病确诊应结合患者症状/体征以及其它检查方法等综合考虑，检测结果阴性也不能排除林奇综合征的可能；该产品存在假阳性的可能，说明书中已明确检测结果阳性不作为林奇综合征确诊的唯一依据，该类病例临床上

应结合病例其他诊断及检测方法进一步确认病例状态。本产品通过产品说明书明确了本产品的局限性，降低产品临床应用风险。产品风险可接受。

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

本申报项目属于创新医疗器械（创新审查受理号：CQTS1800234）。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。经系统评价后，建议准予注册。

2025 年 1 月 24 日

附件：产品说明书

微卫星不稳定性 (MSI) 检测试剂盒 (荧光 PCR-毛细管电泳法) 说明书

【产品名称】

微卫星不稳定性 (MSI) 检测试剂盒 (荧光 PCR-毛细管电泳法)

【包装规格】

48 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测结直肠癌患者肿瘤组织 FFPE 样本基因组 DNA 中的 8 个微卫星位点 (NR-21, BAT-25, BAT-26, Mono-27, BAT-52, BAT-56, BAT-59, BAT-60), 通过与正常对照样本检测结果对比, 确定是否发生了微卫星序列长度变化。根据发生序列长度变化的微卫星位点数量, 将结直肠癌分为微卫星高度不稳定、微卫星低度不稳定以及微卫星稳定三种微卫星状态。

本试剂盒的检测结果用于辅助鉴别结直肠癌中可能的林奇综合征患者。

本产品的应用应参考临床相关诊疗指南的要求, 检测结果的解读应结合其他临床诊断信息、疾病家族史及实验室检测信息进行综合分析。

本产品尚未进行有关用药指导的临床性能评价。

【检验原理】

本试剂盒基于荧光 PCR-毛细管电泳技术, 对 8 个单核苷酸重复微卫星位点 (NR-21, BAT-25, BAT-26, Mono-27, BAT-52, BAT-56, BAT-59, BAT-60) 不稳定性进行分析, 同时含有 2 个五核苷酸重复微卫星位点 Penta C 和 Penta D, 作为内对照, 用于同一样本来源的鉴定, 检测潜在的样品混杂或污染。首先分别提取正常组织与癌组织样本的 DNA, 使用本试剂盒中的 5×微卫星引物和 5×微卫星反应液配制成 PCR 反应液, 对正常组织与癌组织 DNA 进行 PCR 扩增, 用人基因组 DNA (10 ng/μL) 作为阳性扩增对照, 用无核酸酶水作为阴性扩增对照, 扩增产物和分子量标志物使用 3500Dx 基因分析仪进行电泳, 最后使用 GeneMapper® 软件进行数据分析, 对比正常组织与癌组织的检测结果, 判定癌组织样本位点状态。

表 1. 检测位点信息表

	检测位点	荧光标记
单核苷酸重复位点	NR-21	FAM
	BAT-60	FAM
	BAT-25	JOE
	BAT-59	JOE
	BAT-26	TMR
	BAT-56	TMR
	MONO-27	ROX
	BAT-52	ROX
对照位点 (五核苷酸重复位点)	PentaC	JOE
	PentaD	FAM

【主要组成成分】

表 2. 微卫星不稳定性 (MSI) 检测试剂盒主要组成成分

试剂组分名称	规格/管	主要成分
5×微卫星引物	100 μL×1	人工合成寡核苷酸
5×微卫星反应液	100 μL×1	dNTPs, Taq 酶, MgCl ₂ , Tris-HCl
无核酸酶水	1000 μL×1	无核酸酶水
人基因组 DNA(10 ng/μL)	25 μL×1	2800M DNA, Tris-HCl, EDTA
分子量标志物	25 μL×1	核苷酸片段

注：试剂盒各组分应在有效期内使用，不同批次的试剂盒组分不得混用。

检测必须但试剂盒中不包含的耗材及仪器：

- 核酸提取试剂（上海普洛麦格生物产品有限公司，产品货号：MD1940，备案号：沪闵械备 20190003 号）；
- 1.5mL 离心管；
- 干浴锅；
- 96 孔板离心机；
- 分光光度计；
- 阳极缓冲液槽（Thermo Fisher scientific，货号：4393925，备案号：国械备 20160445 号）；
- 阴极缓冲液槽（Thermo Fisher scientific，货号：4408258，备案号：国械备 20160974 号）；
- 甲酰胺进样溶剂（Thermo Fisher scientific，货号：4407307，备案号：国械备 20160320 号）；
- 96 孔反应板（Thermo Fisher scientific）；
- 0.2 mL PCR 管或 8 联 PCR 管或 96 孔 PCR 板；
- 低吸附带滤芯吸头（10 μL, 100 μL, 200 μL, 1000 μL）及适配移液器；
- Veriti™ Dx 96-well PCR 仪，0.2 mL（Thermo Fisher scientific，注册证编号：国械注进 20172221549）；
- 3500 Dx 8 道毛细管阵列，50 cm（Thermo Fisher scientific，产品货号：4404584）；
- 高分子分离胶 POP-7 Polymer（Thermo Fisher scientific，货号：4393709，备案号：国械备 20170900 号）；
- 3500 Dx 基因分析仪（Thermo Fisher scientific，注册证编号：国械注进 20162220211）；
- 分析软件：GeneMapper® Software(版本号 5.0 或 6.1)（Thermo Fisher scientific）。

【储存条件及有效期】

避光储存在-20℃±5℃，有效期为 24 个月。

开瓶后 2℃~8℃可储存 3 个月或-20℃±5℃可储存 12 个月。

冻融影响：反复冻融不超过 10 次。

生产日期及有效期至见标签。

可在干冰保存状态下（泡沫箱包装）运输 5 天，装箱时干冰覆盖不少于 30KG。运输后开箱时，箱内温度不高于-15℃。

【适用仪器】

适用于 3500 Dx 基因分析仪（Thermo Fisher scientific，注册证编号：国械注进 20162220211）

Veriti™ Dx 96-well PCR 仪, 0.2 mL (Thermo Fisher scientific, 注册证编号: 国械注进 20172221549)

【样本要求】

1. 所选石蜡包埋组织保存不超过 3 年。
2. 适用样本为人类结肠直肠癌 10%中性福尔马林固定石蜡包埋病理组织切片, 切片厚度为 5 μm , 癌组织和正常组织各 1 片, 组织面积大于 0.5 cm^2 , 所用切片样品室温 (10-30 $^{\circ}\text{C}$) 保存不超过 6 个月。
3. 由于肿瘤的复杂性, 所采集的临床样本往往会混有正常组织细胞, 石蜡包埋病理切片样本肿瘤细胞比例应不低于 50%; 若低于 50%, 可将癌组织周围的正常组织刮去以富集癌组织。
4. 使用商业化的试剂盒 (使用上海普洛麦格生物产品有限公司, 产品货号: MD1940, 备案号: 沪闵械备 20190003 号) 来提取石蜡包埋组织 (FFPE) 切片基因组 DNA, 所提 FFPE DNA 需用紫外分光光度计测定浓度和纯度, 其 DNA OD260/OD280 的值不小于 1.5, 浓度大于 2 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 样本 DNA 质量不合格者不得用于检测, 建议重新取切片进行核酸提取, 提取完的 DNA 建议立即进行检测, 否则请于 -20 $^{\circ}\text{C}$ ±5 $^{\circ}\text{C}$ 温度范围内保存, 保存时间不超过 12 个月。

【检验方法】

1. DNA 的提取

(1) 使用商业化的试剂盒-核酸提取试剂 (厂家: Promega, 备案号: 沪闵械备 20190003 号), 按照提取试剂盒说明书对同一患者的癌组织和正常组织 (FFPE) 样本进行 DNA 提取。

(2) 所提 DNA 需用紫外分光光度计测定浓度和纯度, 其 DNA OD260/OD280 的值不小于 1.5, 浓度大于 2 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 样本 DNA 质量不合格者不得用于检测, 建议重新取切片进行核酸提取。

(3) 提取的 DNA 样本于 -20 $^{\circ}\text{C}$ ±5 $^{\circ}\text{C}$ 保存时间不超过 12 个月。

2. PCR 扩增

(1) 室温融化 5 \times 微卫星引物, 5 \times 微卫星反应液, 无核酸酶水及人基因组 DNA。

(2) 每次使用前将试剂涡旋震荡 15 s 以充分混匀。

(3) 准备扩增混合液之前, 先确定扩增反应的数目, 其中包括阳性扩增对照和阴性扩增对照。再增加 1 个反应液以补偿移液造成的损失, 以保证所有的样品有足够的 PCR 反应液。

(4) 将 0.2 mL PCR 管或 8 联 PCR 管或 96 孔 PCR 板置于架上并正确标记。

(5) PCR 反应体系: 表 3 是按照每个样品需要总体积为 10 μL 的反应体系, 其中 DNA 模板为 1 μL 计算的。如果使用的模板体积不是 1 μL , 水的体积要做相应的调整。

注意: 每个反应 DNA 模板用量为 2~5ng, 建议根据测定的样本 DNA 浓度将样本 DNA 稀释至 2ng/ μL -5ng/ μL 后使用。客户可根据实际情况对 DNA 上样量做适当的调整, 上样量不应超过 20ng。

表 3 MSI 检测 PCR 反应配制表

组分		1 个反应(μL)	N+1 个反应(μL)
扩增混合液	5 \times 微卫星引物	2	2 \times (N+1)
	5 \times 微卫星反应液	2	2 \times (N+1)
	无核酸酶水	5	5 \times (N+1)

- (6) 在一个无菌 1.5 mL 离心管中将无核酸酶水，5×微卫星引物，5×微卫星反应液轻轻混匀。
- (7) 每个反应管中加入 9 μL 扩增混合液。
- (8) 向含有扩增混合液的样品管中加入 FFPE DNA (2~5 ng)。
- (9) 设置阳性扩增对照：将人基因组 DNA 用无核酸酶水稀释 10 倍至浓度为 1 ng/μL。取 1 μL(1 ng)稀释的 DNA 加到含有扩增混合液的反应管。
- (10) 设置阴性扩增对照：将 1 μL 无核酸酶水加到含有扩增混合液的反应管中。
- (11) 将 0.2 mL PCR 管或 8 联 PCR 管或 96 孔 PCR 板置于 Veriti™ Dx 96-well PCR 仪中。
- (12) PCR 循环程序设置：

表 4. MSI 检测 PCR 循环程序

阶段	温度	时间	循环数/次
预变性	96℃	1 min	1
变性	96℃	5 s	29
退火延伸	60℃	1 min	
终延伸	60℃	10 min	1
Hold	4℃	/	保持

3. 使用 ABI 3500 Dx 基因分析仪检测扩增片段

- (1) 样品准备：
 - a. 检测体系的配制：按照以下方法混合分子量内标和 Hi-Di™ 甲酰胺，制备上样缓冲液：
 $[(0.5 \mu\text{L 分子量标志物}) + (9.5 \mu\text{L Hi-Di}^{\text{TM}} \text{甲酰胺})] \times (N+1)$ ，涡旋震荡 10-15 s 混匀；
 - b. 在每个反应孔中加入 10 μL Hi-Di™ 甲酰胺/分子量标志物混合液和 1 μL PCR 产物，盖上 Septa；
 - c. 瞬时离心加样板，以去除孔中的气泡；
 - d. 将样本置于 95℃ 变性 3 分钟，立即放在碎冰上或冰水浴中冷却 3 分钟，尽快在分析仪上进行电泳分析。
- (2) 上机检测：
 - a. 按照 3500 Dx 仪器使用说明启动仪器和电脑，打开 Data Collection Software 数据收集软件，将热炉温度设置为 60℃，并点击 Start Pre-heat 按钮提前预热，大约需要 30 分钟。
 - b. 将 96 孔板安装至上样板架上，放置于基因分析仪孔盘上。
 - c. 按照 3500 Dx 仪器使用说明做如表 5 设置：

表 5. MSI 检测毛细管电泳设置

在 Dye Sets 界面：创建新文件选择 G5 Template 选项			
在 Instrument Protocol 界面：创建新文件含以下设置			
• Application Type	选择	Fragment	
• Capillary Length	选择	50cm	
• Polymer	选择	POP7	
• Dye Set	选择	创建的 Dye Set 文件	
• Run Module	选择	Fragment Analysis 50_POP7	
• Oven Temperature	输入	60℃	

• Run Voltage	输入	19.5 kv
• PreRun Voltage	输入	15 kv
• Injection Voltage	输入	1.6 kv
• PreRun Time	输入	180s
• Injection Time	输入	15s
• Run Time	输入	1500s
在 Size Standard 界面：创建新文件含橙色染料的 60, 65, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 标志。		
在 Size Calling Protocol 界面：创建新文件选择新创的 Size Standard 文件并设置最低峰值为 175。		
在 Assays 界面：创建新 MSI Assay 文件连接新创的 Instrument Protocol 和 Size Calling protocol 文件。		
在 File Name Convention 界面：创建新 MSI File 文件。		
在 Results Group 界面：创建新 MSI Result 文件。		

- d. 按照 3500 Dx 仪器使用说明书，在 Define Plate Properties 界面：创建新 Plate 文件，其中 Number of Wells 选择 96；Plate Type 选择 Fragment；Capillary Length 选择 50cm，Polymer 选择 POP-7。然后点击 Save。
- e. 在 Assign Plate Contents 界面，对每个样本进行命名，并选择 c 步骤创建的 MSI Assay 文件，MSI File 文件和 MSI Result 文件，然后点击 Link Plate for Run 开始运行 3500 Dx 基因分析仪。在数据采集的窗口可观察毛细管电泳的总信号图，展开每个泳道的信号图，每运行一个 RUN 大约需要 45 分钟。
- (3) 数据分析：
- a. 按 3500 Dx 基因分析仪的同机分析软件 GeneMapper® 使用说明书将基因分析仪生成的.fsa 源数据导入分析软件。
- b. 在 GeneMapper® Analysis Method 中选择 Microsatellite。
- c. 在 Panel 界面，建立新 MSI Panels，参照表 6 设置。

表 6. MSI Panels 设置

微卫星位点	染料颜色	Min Size	Max Size	位点重复数
NR-21	Blue	75.0	100.0	1
BAT-60	Blue	101.0	165.0	1
Penta D	Blue	175.0	250.0	5
BAT-25	Green	75.0	104.0	1
BAT-59	Green	105.0	178.0	1
Penta C	Green	179.0	250.0	5
BAT-26	Yellow	75.0	110.0	1
BAT-56	Yellow	115.0	200.0	1
Mono-27	Red	90.0	122.0	1
BAT-52	Red	123.0	200.0	1

- d. 在 Size Standards 界面，设置新 MSI Size Standard 文件含如下 60, 65, 80, 100, 120, 140, 160,

180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 橙色标志。

e. 按 3500 Dx 基因分析仪同机分析软件 GeneMapper® 使用说明书进行分析。

【阳性判断值】

微卫星不稳定性 (MSI) 检测是通过比较扩增待检测样本的正常组织与癌症组织 DNA 的等位基因谱而检测得出。将正常组织与癌症组织的每个相应微卫星位点相比，若在待检测样本的癌症组织中出现新的等位基因，并且位移超过 3bp，则认为此位点为微卫星不稳定。MSI 分析系统可以同时扩增和检测 8 个微卫星位点。新等位基因的毛细管电泳图谱常表现为以下几种情况（所有判定阈值均为 ≥ 175 RFU）：

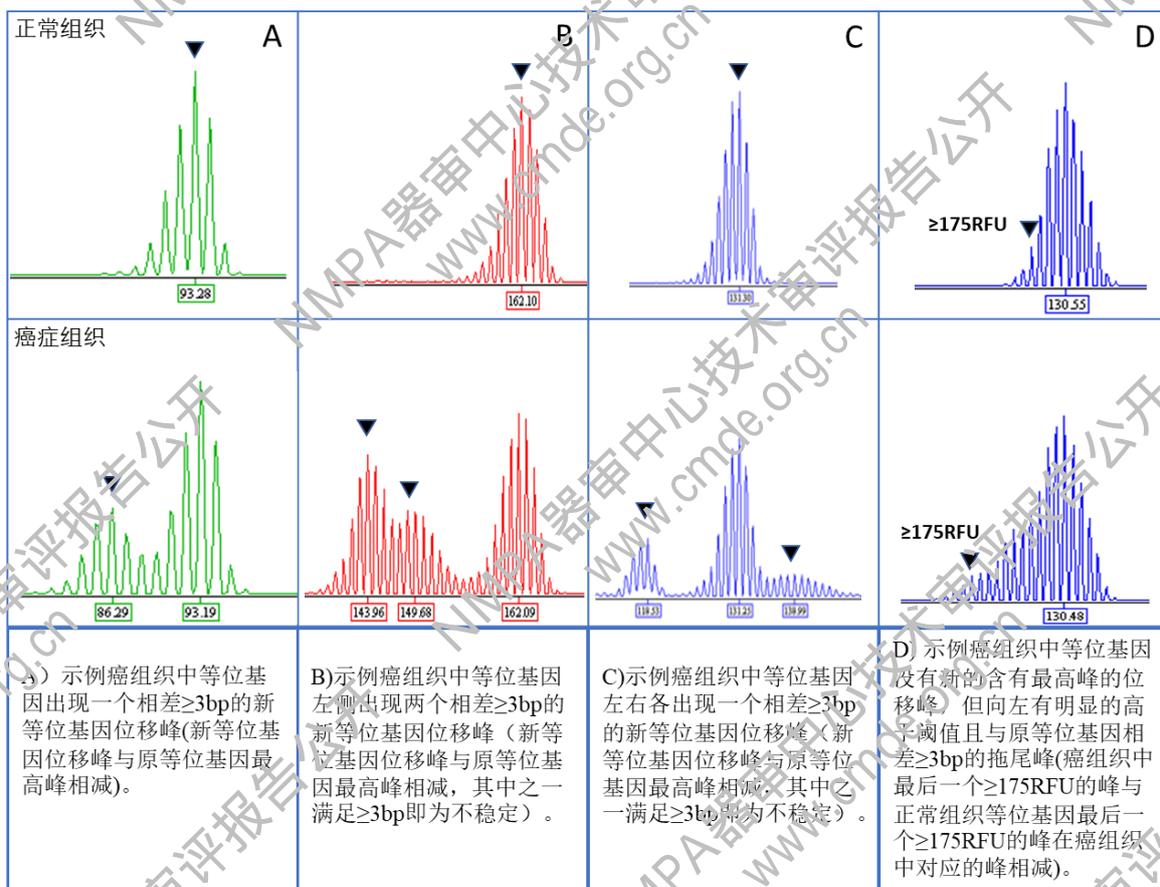


图 1. 微卫星位点等位基因位移相差 ≥ 3 bp 示例图 A-D

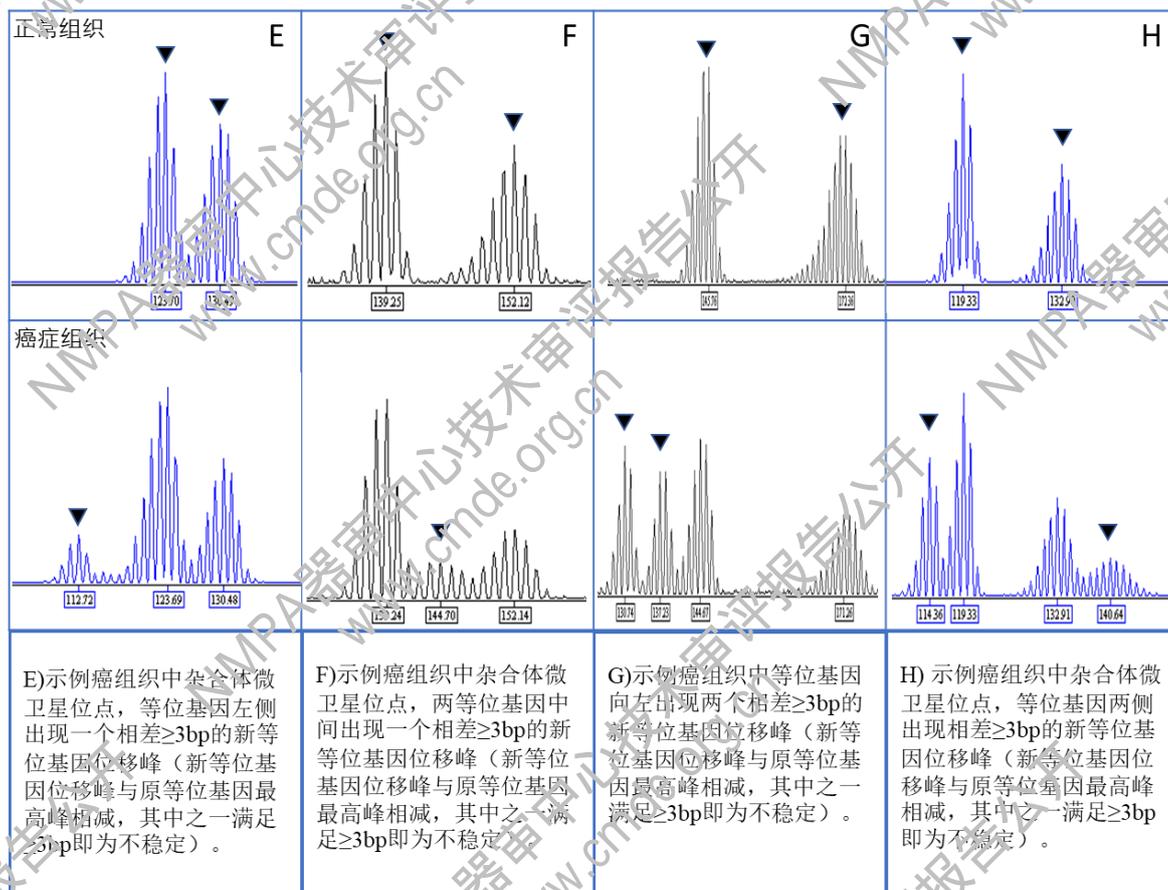


图 2. 微卫星位点等位基因位移相差≥3bp 示例图

E-H

- 逐一判读并记录每个微卫星位点的不稳定性：

表 7.8 微卫星位点判读表

微卫星位点	结果判读：与正常组织相比	
	等位基因片段长度变化≥3bp	等位基因片段长度变化< 3bp
NR-21	微卫星位点不稳定	微卫星位点稳定
BAT-60	微卫星位点不稳定	微卫星位点稳定
BAT-25	微卫星位点不稳定	微卫星位点稳定
BAT-59	微卫星位点不稳定	微卫星位点稳定
BAT-26	微卫星位点不稳定	微卫星位点稳定
BAT-56	微卫星位点不稳定	微卫星位点稳定
Mono-27	微卫星位点不稳定	微卫星位点稳定
BAT-52	微卫星位点不稳定	微卫星位点稳定

- 统计 8 个微卫星位点的不稳定性后，若≥2 个微卫星位点表现为不稳定，则判断样本为微卫星高度不稳定性。

表 8. 微卫星高度不稳定判定标准

判定标准	结果
≥2 个微卫星位点不稳定	微卫星高度不稳定 (MSI-H)

【检验结果的解释】

质量控制：

1. 分子量片段大小 60, 65, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500bp, 显示正确。

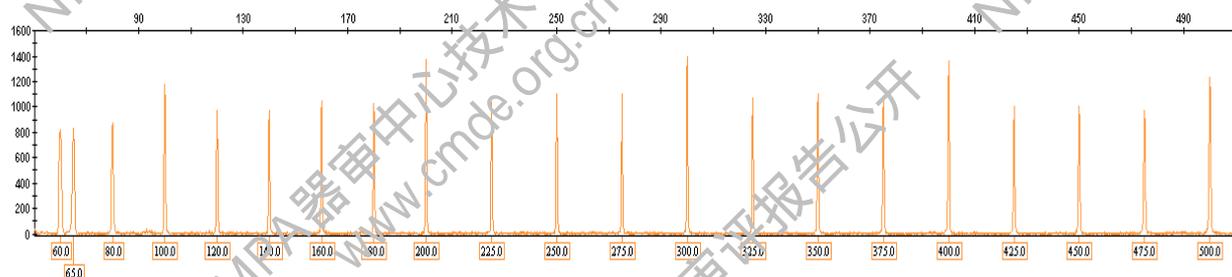


图 3. 分子量标志物片段大小示意图

2. 扩增阴性对照结果：4 个染料通道中 75-250 bp 之间均未出现峰值≥175RFU 的微卫星位点信号。
3. 扩增阳性对照结果：4 个染料通道应在 75-250 bp 之间均出现微卫星位点信号，具体片段大小、扩增图应分别和所列图表一致。上述 2、3 两个条件必须同时满足，否则本次实验无效。

表 9. 微卫星不稳定性 (MSI) 检测试剂盒阳性对照扩增片段信息表

微卫星位点	染料颜色	等位基因范围(bp)	微卫星位点	染料颜色	等位基因范围(bp)
NR-21	Blue	92.5±2bp	Penta C	Green	213±2bp & 217.5±2bp
BAT-60	Blue	119±2bp & 124.5±2bp	BAT-26	Yellow	95.5±2bp
Penta D	Blue	223±2bp & 228±2bp	BAT-56	Yellow	158.7±2bp
BAT-25	Green	93.5±2bp	MONO-2	Red	116.5±2bp
BAT-59	Green	124±2bp & 156±2bp	BAT-52	Red	161.7±2bp

注：使用不同仪器或不同毛细管或不同 polymer 的之间差异可能会引起±2bp 的系统偏差

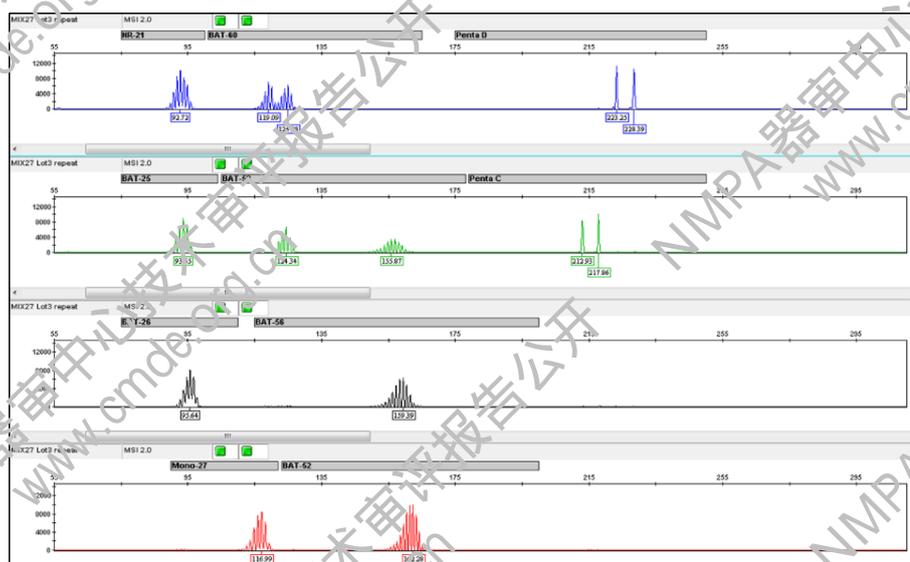


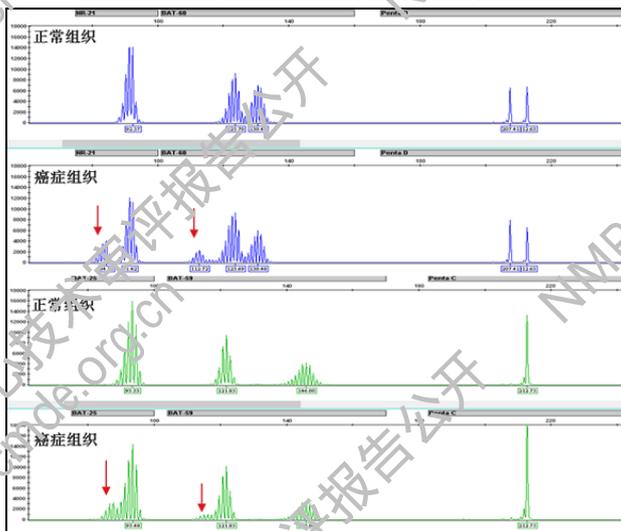
图 4. 微卫星不稳定性(MSI) 检测试剂盒阳性扩增对照电泳示意图。蓝色通道依次为 NR-21, BAT-60, Penta D ; 绿色通道依次为 BAT-25, BAT-59, Penta C ; 黄色通道依次为 BAT-26, BAT-56 ; 红色通道依次为 Mono-27, BAT-52。

4. 试剂盒中两个五核苷酸重复标志物(Penta C, Penta D)是为了核实正常组织与癌组织是否来自同一个体。如正常组织与癌组织结果中的两个五核苷酸重复标志物片段大小不一致, 则样本不匹配, 该样本结果视为无效。Penta C, Penta D 两个位点的正常组织与相应癌组织的片段大小相差不超过 2 bp (不排除少数 MSI-H 样本存在 Penta C, Penta D 也发生位移的情况, 即含除正常组织中等位基因之外的位移峰) 在实验有效的前提下, 样本的微卫星不稳定性状态判断如下表 10 所示。

表 10. 微卫星不稳定状态判定表

判定标准	判定结果	结果解释
≥2 个微卫星位点不稳定	微卫星高度不稳定 (MSI-H)	提示 DNA 错配修复功能缺陷
0 或 1 个 微卫星位点不稳定	微卫星稳定 (MSS) 或微卫星低度不稳定 (MSI-L)	提示 DNA 错配修复功能正常

5. 微卫星不稳定样本毛细管电泳图谱示例



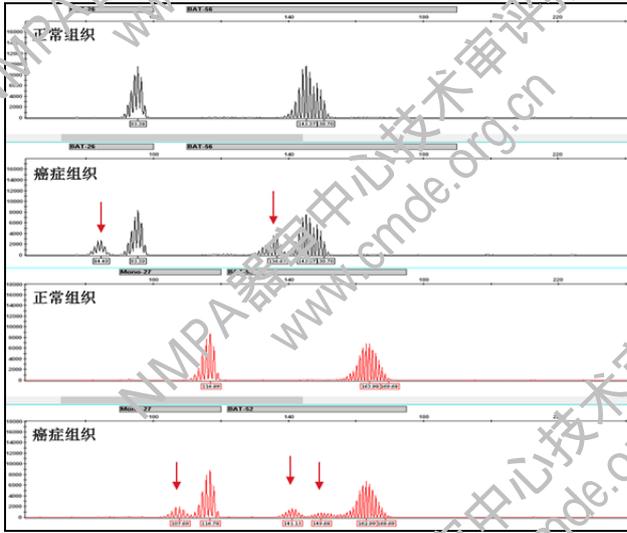


图 5. 微卫星不稳定样本毛细电泳示例图谱：每组图中的上图为正常组织，下图为癌组织，

红色箭头所指为位移峰，此样本 8 个位点均有相差 $\geq 3\text{bp}$ 的位移峰，为微卫星高度不稳定。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者个体化治疗的选择应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。检测结果阳性不能排除林奇综合征的可能，检测结果阳性不作为林奇综合征确诊的唯一依据，该类病例临床上应结合病例其他诊断及检测方法进一步确认病例状态。
2. 仅用于检测指定类型的样本。微卫星不稳定性 (MSI) 检测试剂盒 (荧光 PCR-毛细管电泳法) 可检测结肠直肠癌的 FFPE 样本。
3. 阴性结果不能完全排除靶位点突变的存在，样本中肿瘤细胞过少、核酸过度降解或扩增反应体系中靶基因浓度低于检测限亦可造成阴性结果。
4. 肿瘤组织 (细胞) 可能存在较大异质性，不同部位取样可能会得到不同的检测结果。
5. 样本完整性、DNA 的质量，及存在的潜在干扰物会影响微卫星位点突变的检出。
6. 不合理的样本采集、转运及处理，以及不当的实验操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。
7. 该检测仅限于规定的样本类型及检测系统 (包括适用机型、核酸分离/纯化试剂、检测方法等)。
8. 本检测试剂检测的微卫星位点仅包括检测试剂明确包含的已知的微卫星位点，不包括检测试剂盒申明之外的微卫星位点的检测。
9. 仅限受过专业培训的人使用本试剂盒。

【产品性能指标】

1. 阴性参考品符合率
对国家阴性参考品或企业阴性参考品进行检测，结果应均为微卫星高度稳定 (MSS) 或微卫星低度不稳定 (MSI-L)。
2. 阳性参考品符合率

对国家阳性参考品或企业阳性参考品进行检测，结果应均为微卫星高度不稳定(MSI-H)。

3. 检出限

在 5 ng 基因组 DNA 背景下,对国家检测限参考品进行检测,结果应符合相应国家参考品要求。或在 5 ng 基因组 DNA 背景下,对肿瘤 DNA 含量 10%的企业检测限参考品进行检测,结果均为微卫星高度不稳定。

4. 重复性

对企业重复性参考品进行 10 次重复检测,结果一致且均为微卫星稳定 (MSS)、微卫星低度不稳定 (MSI-L) 或微卫星高度不稳定 (MSI-H)。

5. 特异性

• 交叉反应

针对易引起交叉反应的微生物或非人类基因组基因 ①绿脓假单胞菌、②金黄色葡萄球菌、③肠炎沙氏门菌、④大肠埃希氏菌、⑤白色念珠菌、⑥奇异变形杆菌、⑦屎肠球菌、⑧痢疾志贺氏菌、⑨普通变形杆菌、⑩小鼠 DNA 进行验证,以上交叉反应物质不影响实验检测结果。

• 干扰性

对可能存在的潜在干扰物质如 37 mM 甘油三酯、2 mg/mL 血红蛋白、5%无水乙醇、10%中性福尔马林、1%石蜡以及治疗性药物 3mmol/L 氟尿嘧啶均不影响本试剂盒的检测结果。可耐受 20ng/ μ L 及以下的野生型核酸 DNA (DNA 模板体积为 1 μ L)。

6. 临床试验结果

在 4 家临床机构完成了临床试验。临床试验包括三部分内容:

第一部分,采用本试剂与 MMR 蛋白免疫组化法进行对比试验,共纳入 1003 例样本。试验结果显示,两种方法的阳性符合率为 99.4%,阴性符合率为 98.9%,总符合率为 99.1%。

第二部分,采用本试剂与结直肠癌中林奇综合征诊断的临床参考标准,即林奇相关基因的胚系致病突变 (NGS 方法) 进行比较研究,共纳入 389 例样本,结果显示:本试剂的灵敏度为 97.3%,特异度为 92.9%。

第三部分,采用本试剂检测结果与 Sanger 测序检测结果进行比较研究,共纳入 229 例样本,结果显示:针对每个微卫星位点,本试剂与 Sanger 测序的符合率置信区间下限均在 90%以上。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断,实验前请仔细阅读说明书。
2. 5 \times 微卫星引物和分子量标志物这两个组分对光敏感,使用时注意避光。
3. 试剂盒各组分应在有效期内使用,不同批次的试剂盒组分不得混用。
4. 去离子甲酰胺储存于-20 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C,尽可能减少冻融以避免甲酰胺质量下降。
5. 加样时应使样品完全落入反应液中,不应有样品粘附于管壁上,加样后应尽快盖紧管盖。
6. 核酸提取、PCR 操作和电泳各阶段使用专用的仪器和设备。
7. 按照仪器厂家要求对 3500Dx 基因分析仪进行光谱校正。
8. 若信号太高出现 off-scale 时,可以调整模板用量或进样时间,模板用量可以在 2-20ng 范围内调整,进样时间可以在 5-19s 范围内进行调整。
9. 若信号太低,可以调整模板用量或进样时间,模板用量可以在 2-20ng 范围内调整,进样时间可以在 6-19s 范围内进行调整。
10. 因 3500Dx 仪器间差异,Instrument Protocol 中的参数中的电压,进样时间可做相应微调以

达到最好效果。

11. 由于本试剂盒配套的仪器操作专业性较强，操作人员应经过专业培训才能进行实验操作。
12. PCR 检测应在有资质的临床 PCR 实验室进行，实验室应严格按照卫生部《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 号文件规定进行资质认定和管理。
13. 样本的处理和检测样本的容器、检验过程中使用的处理要符合《医疗废物管理条例》和《医疗卫生机构医疗废物管理办法》。
14. PCR 操作各阶段应在不同的分区进行，分别为试剂准备区、样本处理室和 PCR 扩增室。人、物单向流动。试剂盒打开后人基因组 DNA 放置在样本处理区，分子量内标放置在测序加样区，这两种组分不得在试剂准备区打开。
15. 使用任何试剂时，请穿戴防护眼镜、实验室工作服以及一次性手套。避免这些试剂与皮肤、眼睛或粘膜接触。如意外接触，立即用大量清水冲洗。若不处理，可能导致灼伤。如果发生洒溅，清洁前先用水稀释。
16. 实验前和实验完毕后应该对实验室进行紫外线消毒，并用 10% 84 消毒液和 75%乙醇擦拭工作台和微量加样器。
17. 必须戴手套，并且在处理不同样本和试剂时应及时更换手套以避免污染。
18. 实验过程中必须使用专用的移液器和一次性带滤芯的加样吸头。
19. 避免细菌和 DNA 污染试剂。

【标识的解释】



1. 温度上限。表示医疗器械可安全暴露的环境温度上限。



2. 温度极限。表示医疗器械可安全暴露的环境的温度限制。

【参考文献】

- [1] NCCN Guidelines for Colon Cancer V1.2021.
- [2] NCCN Guidelines for Genetic/Familial High-Risk Assessment V.2019
- [3] NICE Molecular testing strategies for Lynch syndrome in people with colorectal cancer DG27.2017
- [4] 《遗传性结直肠癌临床诊治和家系管理中国专家共识》中华肿瘤杂志 2018 年 1 月第 40 卷第 1 期
- [5] Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. J Clin Oncol. 2010 Jul. 10; 28(20):3219-26.
- [6] 中国临床肿瘤学会（CSCO）结直肠癌诊疗指南（2020 版）
- [7] 结直肠癌分子生物标志物检测专家共识（2018）
- [8] Hereditary nonpolyposis colorectal cancer(HNPCC)/Lynch syndrome[J]. Dtsch Arztebl Int, 2013, 110(3): 32—38.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：上海普洛麦格生物产品有限公司

住所：上海市闵行区新骏环路 88 号 12 幢 B 栋

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址：上海市闵行区新骏环路 88 号 12 幢 102 和 202 室

上海市闵行区新骏环路 138 号 3 幢 101 室

上海市闵行区新骏环路 188 号 8 幢 303 室 B 区和 C 区

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书批准日期/生效日期及修改日期】