

受理号：CSZ2400204

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：PCDHGB7 基因甲基化检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：上海奕谱生物科技有限公司

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
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	11
综合评价意见	14

基本信息

一、申请人名称

上海奕谱生物科技有限公司

二、申请人住所

上海市徐汇区桂平路 333 号 4 号楼 6 层

三、生产地址

上海市金山工业区天工路 857 号 3 幢南楼 3 层

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

序号	名称	组成	24 人份		48 人份		96 人份	
			规格	数量	规格	数量	规格	数量
1	酶混合液	DNA 聚合酶、甲基化敏感限制性内切酶	26μL/管	1	50μL/管	1	50μL/管	2
2	PCR 反应液	PCDHGB7、内参 G1 和内参 G2 引物探针混合物、缓冲液、dNTP	530μL/管	1	1.05mL/管	1	1.05mL/管	2
3	阳性对照	人基因组 DNA	26μL/管	1	50μL/管	1	50μL/管	1
4	阴性对照	人基因组 DNA	26μL/管	1	50μL/管	1	50μL/管	1

(二) 产品预期用途

该产品用于体外定性检测宫颈脱落细胞样本中 PCDHGB7 基因的甲基化情况。

本产品适用于 12 种高危 HPV (hrHPV) 基因型 (31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68 型) 检测阳性的 30 岁及以上女性人群，帮助临床判断是否需要进行阴道镜检查，达到分流管理的目的。

DNA 甲基化作为一种表观遗传修饰伴随肿瘤的发生、发展和治疗的全过程。研究发现 PCDHGB7 基因在宫颈癌及宫颈高级别

上皮内瘤变中显著高甲基化，可作为宫颈癌及宫颈高级别上皮内瘤变标志物用于临床检测。

(三) 产品包装规格

24 人份/盒、48 人份/盒、96 人份/盒。

(四) 产品检验原理

本产品包括两个步骤：样本核酸提取和 DNA 甲基化检测。

1. 样本核酸提取：使用核酸提取试剂对宫颈脱落细胞进行裂解释放核酸，并通过磁珠分离纯化核酸。

2. DNA 甲基化检测：

(1) DNA 前处理：使用甲基化敏感限制性内切酶（MSRE）消化法。利用甲基化敏感的限制性内切酶不能切割甲基化的靶序列 DNA，只能特异性切割非甲基化靶序列 DNA 的特点，将基因组 DNA 底物中非甲基化靶序列 DNA 通过酶切消化，在后续 PCR 检测时特异扩增甲基化的 DNA 靶序列。

(2) 实时荧光 PCR：本试剂盒基于荧光定量 PCR 方法的原理，利用甲基化特异性实时 PCR 反应分析模板 DNA，同时检测 PCDHGB7 基因甲基化位点及质控标记物位点内参基因 GAPDH 片段 G1 和 G2，质控标记物位点 G1 用于评估样本 DNA 质量，G2 用于质控非甲基化 DNA 处理过程，最终根据 PCDHGB7 基因甲基化 DNA 扩增 Ct 值与质控标记物 Ct 值得出样本中 PCDHGB7 基因甲基化值，即 PM 值。

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 DNA 聚合酶、甲基化敏感限制性内切酶、dNTP、引物和探针等。这些原材料均是通过外购的方式获得。其中引物、探针的序列由申请人自行设计，由合成公司制备。申请人对主要原材料进行了供应商的选择，通过功能性试验筛选出合格供应商，制定了主要原材料的质量标准并经检验合格。

2. 企业参考品的设置情况

本产品企业参考品包括阳性参考品、阴性参考品、检出限参考品和精密度参考品。

阳性参考品 4 个，包括 PCDHGB7 基因不同甲基化比率的人基因组 DNA 和临床诊断阳性的临床样本。阴性参考品 4 个，包括 PCDHGB7 基因甲基化阴性的人基因组 DNA 和临床诊断阴性的临床样本。精密度参考品 6 个，包括两个浓度水平和三个不同甲基化比率的人基因组 DNA。检出限参考品 2 个，为两个浓度的检出限水平的人基因组 DNA。

本试剂盒设置了阳性对照和阴性对照，均为人基因组 DNA，可用于检测过程中的质量控制。

(二) 生产工艺及反应体系研究

申请人对试剂盒的反应体系研究包括：引物探针浓度的确定、DNA 聚合酶用量的确定、内切酶浓度的确定、镁离子浓度的确定、

dNTP 浓度的确定、PCR 反应体积的确定、PCR 模板体积的确定。对反应条件的研究包括酶作用温度和时间、PCR 反应退火温度与时间、反应循环数等。通过功能性实验，最终确定了最佳反应体系。

申请人根据试剂盒中试剂及组件的主要生产工艺的研究结果，确定了最佳的生产工艺。

(三) 分析性能评估

本产品分析性能评估内容包括甲基化酶切效率研究、准确度、精密度、检出限、分析特异性（干扰试验和交叉反应）。

甲基化酶切效率研究，基于产品检测原理，使用临床样本对甲基化检测酶切效率进行了研究，确认了产品酶切效率的合理计算方法。

准确度研究中，选择有明确病理诊断的临床样本进行研究，样本涵盖不同的病理结果和产品适用的 HPV 型别，使用配套试剂盒进行 DNA 提取后使用本产品进行甲基化检测。检测完成后，与样本病理诊断结果和甲基化的一代测序检测结果进行比对。本产品检测结果与甲基化的一代测序结果和病理诊断结果一致。

准确度研究中，还采用本产品检测方法与重亚硫酸盐转化后检测方法进行比对。结果显示，本产品与对比方法相比，检测性能的甲基化比例相同，本产品样本用量和最低检测样本浓度较低。

精密度研究包括重复性、室内精密度和室间精密度。重复性使用三个批次试剂对企业参考品中的精密度参考品进行重复测

试，检测 Ct 值的变异系数（CV） $\leq 5.0\%$ 。室内精密度测试和室间精密度的测试均使用三个批次试剂对弱阳性、中等阳性和阴性样本进行测试。室内精密度研究进行了连续 20 天的检测，室间精密度在 3 个实验室进行了 5 天的检测。统计其检测结果，并对批内、批间、日内、日间以及实验室间精密度等进行了评价。研究结果显示试剂对不同甲基化水平的临床样本检测结果的 Ct 值变异系数（CV）均 $\leq 5.0\%$ 。

检出限研究中，使用三个批次的试剂盒，对不同浓度和不同甲基化比率的样本进行研究，并分别进行了检出限的建立和验证研究。确定产品最终检出限为：0.5ng/ μL （150 拷贝/ μL ）的人基因组 DNA 的背景下检测出不低于 2%的 PCDHGB7 基因甲基化。

分析特异性研究采用三个批次试剂盒进行了交叉反应和干扰物质研究。干扰物质研究包括内源性干扰物质：血液和粘蛋白，和外源性干扰物质：润滑液、妇洁洗液、壬苯醇醚、达克宁和阿奇霉素。使用三个批次试剂检测干扰物质添加前后的样本，结果显示试剂盒检测不受样本中常见内源性干扰物质：血液（25% v/v）、黏蛋白（4mg/mL），和外源性干扰物质：润滑液（15%v/v）、妇洁洗液（15% v/v）、壬苯醇醚（10mg/mL）、达克宁（10mg/mL）、阿奇霉素（4mg/mL）的影响。

交叉反应的研究结果表明：本产品与三种常见宫颈癌甲基化基因 ZNF671、PAX1、JAM3 无交叉反应。本产品与 HPV 中低危 6 型、11 型和 53 型阳性样本无交叉反应。本产品与阴道壁高级别

病变、乳腺癌（浸润性导管癌和低级别导管癌）、卵巢癌（高级别浆液性癌和粘液腺癌）、子宫肉瘤无交叉反应，与子宫内膜癌有一定交叉反应。

（四）阳性判断值或参考区间研究

本产品的阳性判断值的研究，采用预期适用人群宫颈脱落细胞的临床样本，包含建立研究和验证研究。使用 652 例样本，包括 $\leq$ CIN1 病例 565 例、CIN2 病例 64 例和 $\geq$ CIN3 病例 23 例。以阴道镜和/或组织病理检测结果为金标准，采用受试者工作特征（ROC）曲线的方法，建立产品阳性结果判断的临界值。

在内参基因检测质控合格的基础上，计算 PCDHGB7 基因甲基化值，即 PM 值。根据约登指数最大的原则与临床对于检测灵敏度和特异性的需求，确定最佳的 Cut Off 值。

使用 512 例临床样本作为验证集，确定最佳的 Cut Off 值为 1.00。当 PM 值 $\geq$ 1.00 时，该样本的检测结果显示为阳性，当样本 PM 值 $<$ 1.00 时，该样本的检测结果显示为阴性。

申请人对阳性判断值公式各参数进行了建立和验证研究，结果符合要求。

（五）稳定性研究

产品的稳定性研究包括两部分，试剂盒稳定性和样本稳定性。试剂盒的稳定性研究包括货架效期稳定性、开封稳定性、冻融稳定性和运输稳定性；样本的稳定性研究包括临床样本和 DNA 在不同温度下的保存稳定性以及冻融稳定性。

试剂稳定性研究：本产品在 $-20\pm5^{\circ}\text{C}$ 条件下避光存储，有效期为12个月，在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 条件下可以稳定保存2个月，在 $-30\pm5^{\circ}\text{C}$ 条件下可以稳定保存12个月。开封后置于 $-20\pm5^{\circ}\text{C}$ 或 $-30\pm5^{\circ}\text{C}$ 保存，有效期为6周，每管试剂冻融次数不得超过3次。

样本稳定性研究：临床样本在室温条件下保存时间不超过5个月，在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 条件下保存时间不超过2个月，在低于 -15°C 条件下保存时间不超过24个月，冻融不超过3次。DNA在低于 -15°C 条件下保存时间不超过24个月，冻融不超过3次。

三、临床评价概述

本产品在中国福利会国际和平妇幼保健院、复旦大学附属妇产科医院、南京市妇幼保健院共三家临床试验机构进行临床试验，采用试验体外诊断试剂与临床参考标准进行比较研究，确认本产品的临床性能，同时对比分析本产品与宫颈细胞学检查对12种hrHPV检测阳性人群进行分流的临床性能。所有病例采用阴道镜检查 and/或组织病理学检查结果为临床参考标准。临床试验共入组30岁以上12种HrHPV检测阳性病例1488例，其中阴道镜和/或组织病理学检查为阴性的病例1011例，CIN1样本354例，CIN2样本78例， $\geq$ CIN3样本45例。临床试验结果显示：以CIN2为临床诊断界值，试验体外诊断试剂临床灵敏度为86.18%（95%CI：78.98%，91.19%），特异度为94.07%（95%CI：92.68%，95.20%）。宫颈细胞学检查临床性能灵敏度为74.80%（95%CI：66.45%，81.64%），特异度为67.62%（95%CI：65.09%，70.05%）。以CIN3为临床诊

断界值，试验体外诊断试剂临床灵敏度为95.56%（95%CI：85.17%，98.77%），特异度为90.02%（95%CI：88.37%，91.46%），宫颈细胞学检查临床性能灵敏度为84.44%（95%CI：71.22%，92.25%），特异度为65.63%（95%CI：63.14%，68.03%）。试验结果显示，试验体外诊断试剂用于12种hrHPV检测阳性患者分流时，与宫颈细胞学检查相比，在灵敏度基本一致的情况下，特异度显著提高（ $P<0.001$ ），可有效降低不必要的阴道镜转诊数量。

针对本产品检测的甲基化位点，采用试验体外诊断试剂与Sanger测序法进行对比试验，共入组临床样本322例，试验结果显示，阳性符合率：96.36%（95%CI：91.02%，98.58%），阴性符合率：95.28%（95%CI：91.54%，97.42%）。试验体外诊断试剂与Sanger测序法检测结果一致性良好。

经评价，该产品临床试验符合技术审评要求。

四、产品受益风险判定

（一）受益评估

本产品体外定性检测人宫颈脱落细胞中 PCDHGB7 基因的甲基化状态，对 12 种高危 HPV（hrHPV）基因型检测阳性的 30 岁及以上女性人群进行分流管理。其临床应用的主要受益在于：使用该产品进行检测，当检测结果为阴性时，提示无宫颈病变或宫颈病变级别较低的可能性大，可避免进行有创的阴道镜及组织活检检查；检测结果为阳性时，提示宫颈病变级别较高的可能性大，

需进一步进行阴道镜和/或组织活检检查。本产品帮助临床判断是否需要进一步进行阴道镜检查，达到分流管理的目的，可以为高危 HPV（hrHPV）患者提供一种无创性的分流检测方法。依据现有的临床试验结果，CIN2+的检测灵敏度为 86.18%，特异度为 94.07%。该检测不能替代宫颈细胞学检查。

（二）风险评估

该试剂盒已知和可预见的安全风险主要有以下几个方面：

1. 与预期用途有关的安全风险，例如样本检测结果阳性不能作为宫颈高级别病变及宫颈癌临床诊断的唯一依据，检测结果阴性也不能完全排除宫颈高级别及以上病变，需结合其他的临床诊断或检查结果综合判断。

2. 与生产有关的安全风险，例如原材料未经过工艺验证。

3. 与运输与储存有关的安全风险，例如在不正确的储存和运输条件下储存、运输试剂盒。

4. 与使用有关的安全风险，例如使用仪器和试剂时没有按照说明书要求进行操作。

5. 生物危险，例如使用后或失效的产品直接丢弃或产品使用过程中产生的废弃物未按照医疗废弃物统一销毁处理。

通过对 PCDHGB7 基因甲基化检测试剂盒(PCR-荧光探针法)从生产原材料、配制、检测、标识、包装、运输、储存、使用方法及安全注意事项、保存和用后处理等全过程危害判定、风险估计、预防化解，通过产品技术要求和使用说明书及企业规章制度

对产品质量的全过程控制和风险防范措施，已将产品的安全风险系数降到了验收准则规定的可接受范围内，同时采取降低风险的措施后没有引入新的风险。在目前认知水平上，认为该产品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：

该产品用于体外定性检测宫颈脱落细胞样本中 PCDHGB7 基因的甲基化情况。本产品适用于 12 种高危 HPV（hrHPV）基因型（31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68 型）检测阳性的 30 岁及以上女性人群，帮助临床判断是否需要进行阴道镜检查，达到分流管理的目的。

DNA 甲基化作为一种表观遗传修饰伴随肿瘤的发生、发展和治疗的全过程。研究发现 PCDHGB7 基因在宫颈癌及宫颈高级别上皮内瘤变中显著高甲基化，可作为宫颈癌及宫颈高级别上皮内瘤变标志物用于临床检测。

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

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材料进行系统评价，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。

2025 年 6 月 30 日

附件：产品说明书

PCDHGB7 基因甲基化检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：PCDHGB7 基因甲基化检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

24 人份/盒、48 人份/盒、96 人份/盒

【预期用途】

该产品用于体外定性检测宫颈脱落细胞样本中 PCDHGB7 基因的甲基化情况。

本产品适用于 12 种高危 HPV（hrHPV）基因型（31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68 型）检测阳性的 30 岁及以上女性人群，帮助临床判断是否需要进行阴道镜检查，达到分流管理的目的。

DNA 甲基化作为一种表观遗传修饰伴随肿瘤的发生、发展和治疗的全过程。研究发现 PCDHGB7 基因在宫颈癌及宫颈高级别上皮内瘤变中显著高甲基化，可作为宫颈癌及宫颈高级别上皮内瘤变标志物用于临床检测。

【检验原理】

本产品包括两个步骤：样本核酸提取和 DNA 甲基化检测。

- 1. 样本核酸提取：使用核酸提取试剂对宫颈脱落细胞进行裂解释放核酸，并通过磁珠分离纯化核酸。
- 2. DNA 甲基化检测：

（一）DNA 前处理：使用甲基化敏感限制性内切酶（MSRE）消化法。利用甲基化敏感的限制性内切酶不能切割甲基化的靶序列 DNA，只能特异性切割非甲基化靶序列 DNA 的特点，将基因组 DNA 底物中非甲基化靶序列 DNA 通过酶切消化，在后续 PCR 检测时特异扩增甲基化的 DNA 靶序列。

（二）实时荧光 PCR：本试剂盒基于荧光定量 PCR 方法的原理，利用甲基化特异性实时 PCR 反应分析模板 DNA，同时检测 PCDHGB7 基因甲基化位点及质控标记物位点内参基因 GAPDH 片段 G1 和 G2，质控标记物位点 G1 用于评估样本 DNA 质量，G2 用于质控非甲基化 DNA 处理过程，最终根据 PCDHGB7 基因甲基化 DNA 扩增 Ct 值与质控标记物 Ct 值得出样本中 PCDHGB7 基因甲基化值，即 PM 值。

【主要组成成分】

序号	名称	组成	24 人份		48 人份		96 人份	
			规格	数量	规格	数量	规格	数量
1	酶混合液	DNA 聚合酶、甲基化敏感限制性内切酶	26μL/管	1	50μL/管	1	50μL/管	2
2	PCR 反应液	PCDHGB7、内参 G1 和内参 G2 引物探针混合物、缓冲液、dNTP	530μL/管	1	1.05mL/管	1	1.05mL/管	2
3	阳性对照	人基因组 DNA	26μL/管	1	50μL/管	1	50μL/管	1
4	阴性对照	人基因组 DNA	26μL/管	1	50μL/管	1	50μL/管	1

注 1：不同批次组分不能混用。

注 2：试剂盒以外必需的设备 and 材料

- 1) 荧光定量 PCR 仪
- 2) 核酸提取试剂（备案号：沪金械备 20210100 号；生产商：上海奕谱金鼎生物科技有限公司）
- 3) 生物安全柜
- 4) 移液器及吸头
- 5) 离心机
- 6) PCR 反应管（96 孔板、高透明 qPCR 封板膜）
- 7) 配套分析软件：PCDHGB7 基因甲基化检测分析软件（V2.0）（医疗器械注册证书编号：鲁械注准 20242210006）
- 8) 宫颈拭子采样器/拭子：宁波华莱斯医疗器械有限公司生产的一次性使用宫颈采样拭子（浙械注准 20172181163）

【储存条件及有效期】

1. 储存条件及有效期

-20±5℃避光保存，有效期为 12 个月。

在 2-8℃的可以稳定保存 2 个月，在-30±5℃条件下可以稳定保存 12 个月，生产日期和使用期限见标签。

2. 开封有效期

本试剂开封后请置于-20±5℃或-30±5℃条件下避光保存，有效期为 6 周。应尽量避免冻融，每管试剂冻融次数不得超过 3 次。

3. 运输有效期

运输温度为-15℃以下，运输时间不超过 6 天，到货后按要求保存，产品可以有效保存至效期末。

【适用仪器】

ABI7500 荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

1. 样本类型：女性宫颈脱落细胞样本。

2. 样本的收集：

按专用的细胞采集系统，采集人宫颈脱落细胞样本，保存于碧迪公司的样本保存液（国械备 20181336 号）。

3. 样本的保存：

样本可于室温（10-30℃）保存 5 个月，2~8℃条件下样本可保存 2 个月，低于-15℃条件下样本可保存 24 个月。冷冻的样本需室温（10-30℃）下解冻后处理，避免反复冻融超过 3 次。

提取后的 DNA 样本在低于-15℃的条件下保存时间不超过 24 个月，冻融不超过 3 次。

【检验方法】

1. 试剂准备（试剂准备区）

1.1 从试剂盒中取出酶混合液、PCR 反应液，冰箱 2~8℃或冰上解冻，充分融化后，轻轻振荡混匀，并作短暂离心后置于冰或冰盒上备用。

1.2 根据待检测数（n），按照下表配制甲基化检测反应液。n=待检测样本数+阴性对照+阳性对照。阴性对照和阳性对照为 DNA，不参与提取，可以直接检测。

反应液配制表（每人份）

反应体系组份	加量(μL)/人份	n+2 人份
酶混合液	1μL	n+2 μL
PCR 反应液	21μL	21×（n+2）μL
总体积	22μL	22×（n+2）μL

2. 样本处理（样本处理区）

宫颈脱落细胞使用经验证的核酸提取试剂（备案号：沪金械备 20210100 号；生产商：上海奕谱金鼎生物科技有限公司），按照说明书进行核酸提取。

核酸提取步骤：

- 1) 将采集样本涡旋充分混匀后，即为待测样本；
- 2) 取 800μL 样本到 1.5mL EP 管中，10000 rpm 离心 2min；
- 3) 去上清，加入 300μL 消化液 A 和 20μL 蛋白酶 K，涡旋混匀；
- 4) 65℃加热孵育 2 小时，中间每隔 30min 颠倒混匀 1 次（或 56℃放置 10min，然后 90℃放置 25min），溶液应变清亮；
- 5) 取出管子，瞬离，加入 300μL 裂解液 L 涡旋混匀，瞬离，再加入 300μL 异丙醇（或 300μL 无水乙醇），涡旋混匀，瞬离；
- 6) 加入 10μL 磁珠悬液 2（确认已充分涡旋混匀），涡旋混匀，室温静置 2 分钟，中间涡旋混匀 1 次；
- 7) 静置好后，瞬离，将管子置于磁力架上吸附 1 分钟；
- 8) 吸走上清（注意不要碰到磁珠），从磁力架上取下管子，加入 500μL 洗涤液 A（确认已加入无水乙醇），涡旋震荡 2 分钟，瞬离，置于磁力架吸附 1 分钟；

- 9) 吸走上清（注意不要碰到磁珠），从磁力架上取下管子，加入 600μL 洗涤液 B（确认已加入无水乙醇），涡旋震荡 2 分钟，瞬离，置于磁力架吸附 1 分钟；
- 10) 重复上一步骤；
- 11) 尽量吸走上清，在磁力架上室温晾干 5 分钟；
- 12) 取下管子，加入 100μL 洗脱液，用手指弹匀，放入 56℃ 水浴或金属浴 5 分钟；
- 13) 取出管子，瞬离，将管子置于磁力架上吸附 2 分钟，吸取上清液转移至新的 1.5mL EP 管中（勿吸到磁珠），并于适当条件保存。

注 1：提取好的 DNA 应及时用于检测，否则应放置于 -15℃ 以下保存（不超过 24 个月，冻融不超过 3 次），再次使用时，将提取好的 DNA 充分融化、混匀并瞬时离心，取上清液用于 PCR 反应。

注 2：以上是手动操作磁珠法核酸提取步骤，自动化操作磁珠法核酸提取步骤见附录一。

3. 加入检测样本（样本处理区）

在上述准备好反应体系中分别加入处理好的待测样本、阴性对照、阳性对照各 8μL，终体积为 30μL/孔，封好封板膜，混匀，瞬时低速离心。

4. PCR 扩增（PCR 扩增区）

4.1 样品设置：根据样本类型设置样本编号、PC 和 NC。（注：为保证后续自动分析软件正确识别，请务必将阳性对照、阴性对照分别设置为 PC、NC）

4.2 荧光通道选择：每个样品选择 FAM、CY5 和 ROX 共 3 个荧光通道，淬灭荧光（Quencher）设置为 MGB，参比荧光（Passive Reference）设置为 None。

4.3 反应条件设定

步骤		温度（℃）	时间	循环数（次）
1	模板 DNA 处理	37	30 min	1
2	热启动、预变性	95	3 min	1
3	变性	95	15 sec	45
	退火、延伸及检测荧光	60	60 sec	
PCDHGB7 检测通道：FAM；G1 检测通道：CY5；G2 检测通道：ROX。				

反应体积设定为 30μL。

4.4 保存文件，运行程序。

5. 结果分析

5.1 Ct 值确定

PCR 反应结束后，检查扩增曲线是否正常，扩增曲线正常时进行设置与 Ct 值分析，将基线起始和终止循环数设为 3~15（根据实际情况，可在一定范围内变化），荧光阈值根据设备信号值进行调整设定；一般 FAM 通道荧光阈值 4.0E+04~6.0E+04，CY5 通道荧光阈值 2.0E+04~4.0E+04，ROX 通道荧光阈值 2.0E+04~4.0E+04。

5.2 结果计算

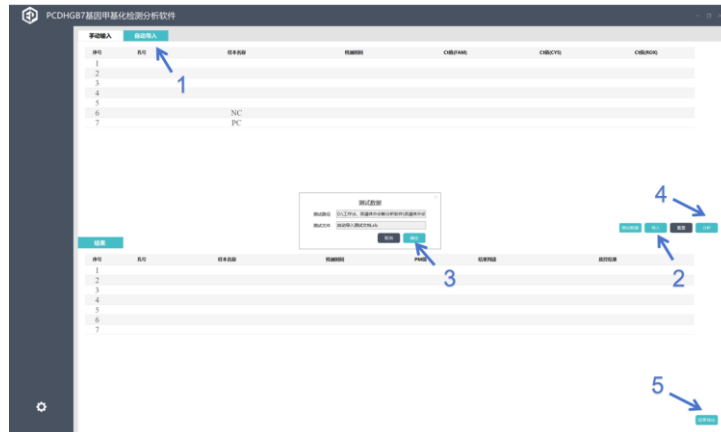
将 PCR 软件导出的检测结果导入 PCDHGB7 基因甲基化检测分析软件（V2.0），点击“分析”，软件将自动进行分析，给出甲基化检测结果 PM 值、阴性和阳性判定结果和质控结果。

1、7500下机excel数据

自动导入测试文档

2、选择分析软件自动导入，点击导入，选择excel文件（按顺序点击1、2、3）

3、点击分析，结果导出（点击4和5）



【阳性判断值】

使用 652 例临床样本，根据扩增 Ct 值计算的甲基化检测结果 PM 值，使用 ROC 曲线法确定试剂盒的阳性判断值，根据灵敏度和特异性综合分析最终选择 cut-off 值为 1.00。

1. 当样本 PM 值大于等于 1.00 时，该样本的检测结果显示为阳性，建议阴道镜或其他临床诊断方法进一步确诊或排除疾病。
2. 当样本 PM 值小于 1.00 时，该样本的检测结果显示为阴性。

【检验结果的解释】

1. 甲基化阳性对照：质控结果应为“合格”；甲基化阴性对照：质控结果应为“合格”；两个条件必须同时满足，否则本次试验无效。
2. 当 G1 通道 Ct 值 > 30.00 或酶切效率（DR，由内参基因 Ct 值计算得出）≤ 95.00% 或各通道 Ct 值 < 15.00 时，样本检测的质控结果显示为“不合格”，反之则显示为“合格”。
3. 样本检测的质控结果应为“合格”，否则该样本本次检测无效。
4. 样本检测的质控结果为“不合格”时，表示样本质量不符合检测要求，本次甲基化检测失败，需要重新提取，重新提取检测仍不合格者，需进行重新采样。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒适用于临床辅助诊断，对患者的临床治疗方案的选择应结合其它医学检查综合考虑。
2. 本试剂检测结果应结合宫颈细胞学检查及其他相关医学检查结果进行综合分析，不得单独作为患者管理的依据。
3. 检测结果为阳性的患者需接受进一步的临床检测进行确诊。
4. 当样本在收集、处理、运输以及保存不符合要求时，可能出现假阴性或假阳性结果。
5. 本检测试剂检测范围仅包括说明书中明确包含的甲基化位点，不包括检测试剂盒申明之外的甲基化位点检测。

【产品性能指标】

1. 本试剂盒最低可在 0.5ng/μL（150 拷贝/μL）的人基因组 DNA 的背景下检测出不低于 2% 的 PCDHGB7 基因甲基化。
2. 检测企业阴性、阳性参考品，符合率为 100%。检测企业检测限参考品，阳性检出率 ≥ 95.0%。检测企业精密度参考品，阴阳性符合率为 100%，变异系数 ≤ 5%。
3. 室内精密度研究进行了连续 20 天的检测，室间精密度在 3 个实验室进行了 5 天的检测。本试剂盒的重复性、室内精密度、室间精密度的变异系数 ≤ 5.0%。
4. 试剂盒检测不受样本中常见内源性干扰物质：血液（25% v/v）、黏蛋白（4mg/mL），外源性干扰物质：润滑液（15% v/v）、妇洁洗液（15% v/v）、壬苯醇醚（10mg/mL）、达克宁（10mg/mL）、阿奇霉素（4mg/mL）的影响。
5. 交叉反应：与三种常见宫颈癌甲基化基因 ZNF671、PAX1、JAM3 无交叉反应。本产品与 HPV 中低危 6 型、11 型和 53 型阳性样本无交叉反应。本产品与阴道壁高级别病变、乳腺癌（浸润性导管癌和低级别导管癌）、卵巢癌（高级别浆液性癌和粘液腺癌）、子宫肉瘤无交叉反应，与子宫内膜癌存在一定交叉反应。
6. 临床试验结果：在 3 家临床试验机构进行临床试验，共纳入 1488 例临床样本，考核试剂与阴道镜和/或组织病理学金标准相比，CIN2+ 的检测灵敏度为 86.18%，特异性为 94.07%；CIN3+ 的检测灵敏度为 95.56%，特异性为 90.02%。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅供体外检测使用。
2. 本试剂盒使用前请仔细阅读本说明书，实验操作人员应接受过基因扩增或分子生物学方法检测的专业培训，具备相关的实验操作资格，实验室应具备合理的生物安全防护设施及防护程序。
3. 整个实验过程应在三个区域分别进行（试剂准备区、样本处理区、PCR 扩增区），请严格在不同区域操作；各区域的仪器、设备、耗材和工作服均为专用，不得交叉使用，实验后请立即清洁工作台。
4. 本产品使用前应在冰箱 2~8℃或冰上充分融化，混匀并瞬时低速离心。
5. 每次实验应设置阴性、阳性对照品。不同批号的试剂请勿混用，且在有效期内使用试剂盒。
6. 样本尽可能及时检测，提取过程应严防 DNA 酶污染及操作不当导致的 DNA 降解。
7. 在-15℃以下保存的 DNA 样本，加样前应在室温充分融化、混匀并离心后使用。
8. 反应液分装时尽量避免产生气泡，放入扩增仪前应检查各 PCR 反应管是否盖紧，避免对仪器及环境造成污染。
9. 本试剂盒涉及的检测样本应视为具有传染性物质，操作和处理均需符合卫生部《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》相关要求。

【参考文献】

1. Shihua Dong, Qi Lu, Peng Xu, et al. Hypermethylated PCDHGB7 as a universal cancer only marker and its application in early cervical cancer screening. Clin. Transl. Med. 2021;11:e457.
2. Koch A, Joosten SC, Feng Z, et al. Analysis of DNA methylation in cancer: location revisited. Nat Rev Clin Oncol. 2018;15:459-466.
3. Junghans D, Haas IG, Kemler R. Mammalian cadherins and protocadherins: about cell death, synapses and processing. Curr Opin Cell Biol. 2005;17:446-452.
4. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, et al. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. Vaccine;26(Suppl 10):2008.

【基本信息】

注册人名称：上海奕谱生物科技有限公司

住所：上海市徐汇区桂平路 333 号 4 号楼 6 层

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

受托企业的名称：上海奕谱金鼎生物科技有限公司

住所：上海市金山工业区天工路 857 号 3 幢南楼 3 层

生产地址：上海市金山工业区天工路 857 号 3 幢南楼 3 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】

国械注准：

【说明书批准日期/生效日期及修改日期】

批准日期

生效日期

修改日期