

受理号：CSZ2400122

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：12种微小核糖核酸（microRNA）检测
试剂盒（荧光 RT-PCR 法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：杭州觅因生物科技有限公司

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.....	11
四、 产品受益风险判定.....	13
综合评价意见.....	15

基本信息

一、申请人名称

杭州觅因生物科技有限公司

二、申请人住所

浙江省杭州经济技术开发区 6 号大街 260 号 18 幢五层

三、生产地址

浙江省杭州经济技术开发区 6 号大街 260 号 18 幢五层

浙江省杭州市钱塘新区 6 号大街 260 号 3 幢 103、105 室

技术审评概述

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

组分	主要成分	装量规格
RT 反应液	dNTPs、RT Buffer、RT 引物	165 μL/管
PCR 反应液	dNTPs、PCR Buffer、SYBR Green 染料、参比荧光染料 ROX	4000 μL/管
RT 酶	逆转录酶	16 μL/管
PCR 酶	Taq DNA 聚合酶	65 μL/管
参考品	血清	460 μL/管
空白对照	无核酸酶水	220 μL/管
阳性质控品	噬菌体单链 RNA、12 种靶标 microRNA 混合液	50 μL/管
阴性质控品	噬菌体单链 RNA	50 μL/管
引物板	PCR 引物	1 板/包

注意：不同批号试剂盒中各组分不可互换。

具体内容详见说明书。

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于体外检测人血清样本中 12 种 microRNA（包括 hsa-miR-29c-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-93-5p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-126-3p、hsa-miR-183-5p 和 hsa-miR-340-5p）的相对含量，通过“12 种微小核糖核酸（microRNA）检测分析软件”计算综合风险值，用于对胃癌高风险人群的筛查。综合风险值大

于阳性判断值的样本为阳性，表示受检者体内可能有胃癌和/或高级别上皮内瘤变，需要进一步接受胃镜检查；反之，如果综合风险值低于或等于阳性判断值，表示受检者体内有胃癌和/或高级别上皮内瘤变的可能性低，但并不能完全排除疾病风险。

鉴于受试者为高风险人群，因此在必要时仍应建议进行胃镜检查。

本试剂盒适用人群为年龄 45-74 岁的胃癌高风险人群（高风险人群判定参照《胃癌筛查与早诊早治方案》（2024 版））。本产品不能替代胃镜，不能用于普通人群的胃癌筛查，临床诊断过程中不应以本产品检测结果作为临床诊断的唯一依据。

表 2 12 种 microRNA 列表

序号	基因名称	序号	基因名称
G1	hsa-miR-29c-3p	G7	hsa-miR-140-5p
G2	hsa-miR-424-5p	G8	hsa-miR-30e-5p
G3	hsa-miR-103a-3p	G9	hsa-miR-142-5p
G4	hsa-miR-93-5p	G10	hsa-miR-126-3p
G5	hsa-miR-181a-5p	G11	hsa-miR-183-5p
G6	hsa-miR-21-5p	G12	hsa-miR-340-5p

（三）产品包装规格

16 人份/盒。

（四）产品检验原理

本试剂盒基于荧光 RT-PCR 技术，对血清样本中含有的 12 种与胃癌发生相关的 microRNA 进行相对含量的检测。

本试剂盒是采用核酸提取或纯化试剂提取血清样本中的 microRNA，在单个反应中将来自样本的 12 个目标 microRNA 利用基于茎环的特异性逆转录引物转化为 cDNA。再以逆转录后的 cDNA 为模版，在不同的反应体系中做荧光定量 PCR 扩增，12 对特异性的 PCR 引物能够分别与 12 种 microRNA 逆转录后的 cDNA 互补结合形成双链，反应试剂中包含的 SYBR Green 染料，会与双链 DNA 结合并释放荧光信号，被检测到的荧光信号强度可以反映 12 种 microRNA 的含量。

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：逆转录引物、荧光定量 PCR 引物、RT 酶、PCR 酶、RT 预混液、PCR 预混液、dNTPs、microRNA。主要原材料均为外购。申请人选择有资质的供应商提供的原料，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要求并经检验合格。

引物由申请人自行设计，由合成公司经过合成和纯化后获得；RT 酶和 PCR 酶由原材料供应商克隆表达后获得；dNTPs 由供应商化学合成获得。

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，包括阳性参考品、阴性参考品、检测限参考品、精密度参考品、空白限参考品。

企业阳性参考品 6 份，分别命名为 P1~P6，其中 P1、P6 为不同浓度的人工合成 12 种 microRNA 的模拟样本，P2~P5 为不同病理分期的胃癌人血清。

企业靶标阳性参考品 2 份，分别命名为 P7、P8，为不同浓度的人工合成 12 种 microRNA 的模拟样本。

企业阴性参考品 8 份，分别命名为 N1~N8，其中 N1 为人工合成 12 种 microRNA 的模拟样本，N2~N8 为非胃癌人血清(包括：不同胃部疾病、其他消化道癌症、非消化道癌症、正常人血清)。

企业靶标阴性参考品 1 份，命名为 N9，为含靶标同源序列、不含 12 种 microRNA 靶标的模拟样本。

企业检测限参考品 1 份，为人工合成 12 种 microRNA 的模拟样本。

企业靶标精密度参考品 2 份，分别命名为 J1、J2，为不同浓度的人工合成 12 种 microRNA 的模拟样本。

企业精密度参考品 5 份，分别命名为 J3、J4、企业精密度强阳性参考品、企业精密度弱阳性参考品和企业精密度阴性参考品，其中 J3、J4 为不同浓度的人工合成 12 种 microRNA 的模

拟样本，企业精密度强阳性参考品、企业精密度弱阳性参考品和企业精密度阴性参考品为人血清。

企业空白限参考品 1 份，为不含靶标 microRNA 的模拟样本。

本试剂盒设置了阴阳性质控品，其中阴性质控品为人工合成的不含靶标 microRNA 的溶液，阳性质控品为含人工合成的 12 种 microRNA 的溶液，用于检测过程中试剂和仪器的质量控制。

(二) 生产工艺及反应体系研究

申请人对反应中的各个步骤进行了研究，包括逆转录过程的反应体系和反应条件、荧光定量反应体系和反应条件，涉及各反应中样本及各组分用量、反应时间和温度等参数，最终确定了整个反应体系的步骤、用量及最佳反应条件。

申请人根据试剂盒组成，确定了生产流程、关键过程和工艺参数，确定了最佳的生产工艺。

(三) 分析性能评估

分析性能评估主要包括：准确度、精密度、分析特异性、检测限等。

1. 准确度

(1) 在准确度研究中，申请人使用 3 批次试剂盒对临床样

本进行检测（包括不同胃癌分期、不同胃部疾病样本，正常样本、其他癌症样本等），结果表明阴性符合率为 100%，阳性符合率为 100%。

（2）申请人对试剂盒的扩增产物进行测序，测序结果与靶标序列一致。

（3）申请人采用临床样本、不同靶标浓度的模拟样本与数字 PCR（ddPCR）进行方法学比对，结果表明试剂盒检测结果 CT 值与数字 PCR（ddPCR）检测结果（取 \log_{10} ）呈高度相关。

2. 精密度

精密度研究分别从单靶标及联合靶标检测性能进行研究。

（1）单靶标检测精密度

单靶标检测精密度研究中，申请人采用 3 批次试剂盒、不同人员、设备、实验室、天数检测的 CT 值的 CV 均 $\leq 5\%$ ，符合精密度要求。

（2）联合靶标检测精密度

联合靶标检测精密度研究中，申请人采用 3 批次试剂盒、不同人员、设备、实验室、天数检测，计算联合检测风险值结果均符合标准要求。

3. 分析特异性

分析特异性研究包括交叉反应研究和内、外源干扰研究。

交叉反应：交叉试验显示，检测靶标的同源序列 **microRNA** 对检测结果无影响；消化道癌症（肝癌、结直肠癌、食管癌）和非消化道癌症（肺癌、乳腺癌、甲状腺癌），观察到阳性检测结果，但整体特异性符合产品性能要求。在干扰研究中，申请人使用三批试剂对潜在的内、外源性干扰物质进行评价，结果表明样本中含有以下干扰物质：血红蛋白、白蛋白、胆红素、甘油三酯、胆固醇、葡萄糖、尿酸、卡托普利、奥美拉唑、西咪替丁、多潘立酮、阿莫西林、维生素 C、盐酸二甲双胍片、阿司匹林、对乙酰氨基酚、同源序列浓度（ 2×10^7 拷贝/ μL ）时，对检测结果没有影响。

4. 检出限

申请人使用三批试剂对试剂盒的检出限进行研究，以梯度稀释的人工合成 **microRNA** 为样本，以检出率 $\geq 95\%$ 时所对应的浓度水平确定本试剂盒的检出限，并使用检测限参考品进行验证，结果表明血清样本中每个靶标基因最低检测限为 5×10^2 拷贝/ μL 。

（四）阳性判断值或参考区间研究

申请人收集来自临床机构的血清样本进行阳性判断值的建立和验证研究。其中阳性判断值建立共纳入 621 例样本（包括 217 例阳性样本，404 例阴性样本），采用临床病理学诊断结果

确认样本的阴阳性。

另外，前瞻性社区入组 4140 例样本进行阳性判断值的验证（包括胃癌 74 例，胃部高级别内瘤变 16 例，阴性样本 4050 例），基于前述建立的阳性判断值进行结果统计分析，结果与建立阶段基本一致，表明本试剂盒阳性判断值设置基本合理。

在确定样本质量合格的情况下，根据临床对于检测灵敏度和特异性的需求分析，通过以上研究判定检测样本风险值（Score）> 40.0 时判断为阳性；检测样本风险值（Score）≤ 40.0 时判断为阴性。

（五）稳定性研究

申请人对本产品的实时稳定性、使用稳定性、运输稳定性以及样本的稳定性（包括实时稳定性和冻融稳定性）进行研究，确定了本产品及样本的有效保存时间。

实时稳定性使用企业参考品对三批试剂按照技术要求检测，分别于试剂盒保存的第 0、2、4、6、8、10 和 13 个月进行稳定性试验，检测结果均符合要求，因此试剂盒稳定性为 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 避光储存，有效期 12 个月。此外，申请人还对使用稳定性、运输稳定性、样本稳定性等进行了研究。

三、临床评价概述

申请人在兰州大学第一医院、中国医科大学附属盛京医院、

南方医科大学南方医院、山东大学齐鲁医院、浙江大学医学院附属邵逸夫医院、浙江大学医学院附属杭州第一医院和华中科技大学同济医学院附属协和医院共 7 家临床试验机构完成了临床试验。临床试验主要包括两部分内容：

第一部分，采用试验体外诊断试剂对胃癌高风险人群进行筛查，以胃镜和/或病理检查结果为金标准，评价本产品筛查的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值等指标。临床试验前瞻性入组 7253 例受试者，均为胃癌高风险人群，高风险人群判定参照《胃癌筛查与早诊早治方案》（2024 版）。其中经胃镜和/或病理检查确诊胃癌患者 130 例，高级别上皮内瘤变 19 例。临床试验结果显示，试验体外诊断试剂针对胃癌患者筛查的灵敏度为 81.54%（95%CI: 74.87%，88.21%），对高级别上皮内瘤变患者筛查灵敏度 57.89%，针对胃癌和高级别上皮内瘤变筛查特异度为 78.27%（95%CI: 77.31%，79.22%）；胃癌筛查阳性预测值 6.38%（95%CI: 5.21%，7.56%），阴性预测值 99.43%（95%CI: 99.23%，99.63%）。

第二部分，为进一步验证试验体外诊断试剂针对胃癌的临床灵敏度和特异度，临床试验中同时回顾性纳入不同分期胃癌确诊患者、其他胃部疾病患者和其他癌症患者，采用试验体外诊断试剂进行检测。综合前瞻性和回顾性入组的所有样本，共

入组胃癌患者 334 例（包括 I 期 110 例、II 期 51 例、III 期 74 例、IV 期 40 例）、高级别上皮内瘤变 25 例、其他胃部疾病患者（包括低级别上皮内瘤变、肠上皮化生、萎缩性胃炎、胃部无明显异常等）以及其他癌症患者（包括结直肠癌、食管癌、肝癌、肺癌、乳腺癌等）共 8785 例，评价本产品检测灵敏度和特异度。结果显示试验体外诊断试剂针对胃癌患者检测灵敏度 84.73%（95%CI: 80.72%，88.74%），对高级别上皮内瘤变检测灵敏度为 56%，针对胃癌和高级别上皮内瘤变检测的特异度 78.57%（95%CI: 77.70%，79.43%）。

综上，临床试验结果显示，本产品用于胃癌高风险人群筛查具有良好的灵敏度和特异度，符合技术审评要求。

四、产品受益风险判定

（一）受益评估

胃癌是一种较为常见的癌症，严重威胁我国居民身体健康。研究表明，针对胃癌高风险人群开展筛查与早诊早治能够有效提高人群胃癌早期诊断率，降低死亡率。目前按照胃癌筛查与早诊早治方案（2024 版），胃癌高风险人群均需要进行筛查，但胃镜检查为侵入性检查，患者依从性较差。

本产品针对胃癌高风险人群进行筛查，其临床应用的主要受益在于：评估患病风险，富集人群，促进检测结果为阳性的

人群顺应胃镜检查，获得及时的诊断和治疗。

(二) 风险评估

胃癌筛查与早诊早治方案（2024版）中明确胃癌筛查推荐内镜学检查。胃镜还是胃癌诊断的金标准，本产品明确不能取代胃镜。根据本产品临床试验结果，本产品主要风险在于假阴性和假阳性带来的风险。

为降低假阴性的风险，本产品说明书中明确标注：综合风险值低于或等于阳性判断值，表示受检者体内有胃癌和/或高级别上皮内瘤变的可能性低，但并不能完全排除疾病风险。鉴于受试者为高风险人群，因此在必要时仍应建议进行胃镜检查。

假阳性风险包括额外检查付费和检查并发症，但胃镜并发症发病率很低，据统计，其消化内镜的镜后严重并发症发病率仅为 0.002%，且按照现行筛查指南，对于高风险人群均建议进行胃镜检查。为降低假阳性的影响，本产品说明书中明确标注：本产品不用于普通人群的胃癌筛查。

(三) 风险受益评价结论

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，认为该产品能够较大程度地满足医疗需求，预期为适用人群带来的受益大于风险。

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。

2025 年 9 月 22 日

附件: 产品说明书

12 种微小核糖核酸（microRNA）检测试剂盒

（荧光 RT-PCR 法）说明书

【产品名称】

通用名称：12 种微小核糖核酸（microRNA）检测试剂盒（荧光 RT-PCR 法）

【包装规格】

规格：16 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外检测人血清样本中 12 种 microRNA（包括 hsa-miR-29c-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-103a-3p、hsa-miR-93-5p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-126-3p、hsa-miR-183-5p 和 hsa-miR-340-5p）的相对含量，通过“12 种微小核糖核酸（microRNA）检测分析软件”计算综合风险值，用于对胃癌高风险人群的筛查。综合风险值大于阳性判断值的样本为阳性，表示受检者体内可能有胃癌和/或高级别上皮内瘤变，需要进一步接受胃镜检查；反之，如果综合风险值低于或等于阳性判断值，表示受检者体内有胃癌和/或高级别上皮内瘤变的可能性低，但不能完全排除疾病风险。鉴于受试者为高风险人群，因此在必要时仍应建议进行胃镜检查。

本试剂盒适用人群为年龄 45-74 岁的胃癌高风险人群（高风险人群判定参照《胃癌筛查与早诊早治方案》（2024 版））。本产品不能替代胃镜，不能用于普通人群的胃癌筛查，临床诊断过程中不应以本产品检测结果作为临床诊断的唯一依据。

【检验原理】

本试剂盒基于荧光 RT-PCR 技术，对血清样本中含有的 12 种与胃癌发生相关的 microRNA 进行相对含量的检测。

本试剂盒是采用核酸提取或纯化试剂提取血清样本中的 microRNA，在单个反应中将来自样本的 12 个目标 microRNA 利用基于茎环的特异性逆转录引物转化为 cDNA。再以逆转录后的 cDNA 为模版，在不同的反应体系中做荧光定量 PCR 扩增，12 对特异性的 PCR 引物能够分别与 12 种 microRNA 逆转录后的 cDNA 互补结合形成双链，反应试剂中包含的 SYBR Green 染料，会与双链 DNA 结合并释放荧光信号，被检测到的荧光信号强度（通过 CT 值呈现）可以反映 12 种 microRNA 的含量。

本试剂盒通过“12 种微小核糖核酸（microRNA）检测分析软件”计算样本的综合风险值，计算原理如下：试剂盒在检测样本时同步检测内置参考品，获取参考品及样本的 12 种 microRNA 检测 CT 值。参考品的 12 种 microRNA 检测 CT 值分别同其靶值计算得出 Δ CT 值，用于校准样本对应的 microRNA 检测 CT 值。使用校准后的 CT 值计算样本的综合风险值。

【主要组成成分】

本试剂盒由 RT 反应液、PCR 反应液、RT 酶、PCR 酶、参考品、空白对照、阳性质控品、阴性质控品、引物板组成。不同批号试剂盒中各组分不可互换。试剂盒组成成分详见表 1。

表 1 试剂盒组成成分

组分	主要成分	装量规格
RT 反应液	dNTPs、RT Buffer、RT 引物	165 μ L/管

PCR 反应液	dNTPs、PCR Buffer、SYBR Green 染料、 参比荧光染料 ROX	4000 μL /管
RT 酶	逆转录酶	16 μL /管
PCR 酶	Taq DNA 聚合酶	65 μL /管
参考品	血清	460 μL /管
空白对照	无核酸酶水	220 μL /管
阳性质控品	噬菌体单链 RNA、12 种靶标 microRNA 混 合液	50 μL /管
阴性质控品	噬菌体单链 RNA	50 μL /管
引物板	PCR 引物	1 板/包

试剂盒中未包含血清样本核酸提取或纯化试剂。请使用核酸提取或纯化试剂：杭州觅因生物科技有限公司，浙杭械备 20180690 号，型号 MY-02，货号 ST1002。

【储存条件及有效期】

-20 \pm 5 $^{\circ}\text{C}$ 避光储存；有效期为 12 个月。

生产日期和使用期限见标签。

试剂盒为一次性使用，不得冻融。

试剂开封后未使用组分需-20 \pm 5 $^{\circ}\text{C}$ 存放，取出待用组分放置时间不得超过 4 小时。

试剂盒运输温度同储存温度，运输时间不得超过 4 天。

【适用仪器】

1. 本试剂盒核酸提取步骤适用于 Promega 全自动核酸提取纯化仪 Maxwell[®] CSC。
2. 本试剂盒逆转录步骤适用于 ABI-PCR 扩增仪 Veriti[™] Dx 96 well Thermal Cycler。
3. 本试剂盒 PCR 步骤适用于 ABI-实时荧光定量 PCR 仪 QuantStudio[™] 5。

【样本要求】

本试剂盒检测样本类型为血清。

1. 样本采集：静脉取血不少于 5mL 至促凝管中，轻轻颠倒 8~10 次混匀。
2. 样本处理：将样本静置 30min 至 120min，室温（10-30 $^{\circ}\text{C}$ ）1500 \times g（RCF）离心 15 分钟，取其上清。
3. 样本贮存：-20 \pm 10 $^{\circ}\text{C}$ 储存不超过 1 个月，-80 \pm 10 $^{\circ}\text{C}$ 储存不超过 1 年。血清样品反复冻融不超过 3 次。
4. RNA 提取：按照提取试剂盒说明书提取 RNA。RNA 提取液-80 \pm 10 $^{\circ}\text{C}$ 环境中保存不超过 60 天，冻融次数不超过 3 次。

【检验方法】

用户需自行提供无菌、无核酸酶的 1.5mL 离心管；PCR 专用吸头；无核酸酶的 96 孔深孔板；PCR 膜；无核酸酶水；PCR 用八联管及管盖。

1. 样本准备：

将待测样本（每实验轮次最多可检测 11 个样本）与本试剂盒内参考品、空白对照室温（10-30 $^{\circ}\text{C}$ ）融化后涡旋混匀 5s，离心 5s。

本试剂盒提供 1 管参考品和 1 管空白对照。试剂盒检测血清样本时须同参考品和空白对照一

起提取，其中参考品须提取 2 份，空白对照提取 1 份。

2. RNA 提取：

使用杭州觅因生物科技有限公司生产的核酸提取或纯化试剂（MY-02），使用核酸提取仪进行操作，每个提取样本用量为 200 μ L，洗脱液用量为 50 μ L，具体操作方法见其说明书。

3. 逆转录：

- 1) 试剂准备：从试剂盒中取出 RT 反应液和 RT 酶置于冰上，RT 反应液解冻后涡旋混匀 5s，离心 5s；从试剂盒中取出阴性质控品和阳性质控品置于冰上，解冻后涡旋混匀 5s，离心 5s，待用；
- 2) 加入样本：每次反应须同时进行阴性质控品和阳性质控品的检测。将步骤 2 中提取的 RNA 样本、阴性质控品、阳性质控品分别转移 6 μ L 至两列 PCR 用八联管中；
- 3) 配制反应混合液：取 148.5 μ L RT 反应液加入至新的 1.5mL 离心管中，加入 13.5 μ L RT 酶，进行混匀；
- 4) 加反应混合液：将步骤 3) 所得混合液 9 μ L 每孔加至步骤 2) 八联管中；
- 5) 混匀：将八联管放入混匀仪中 1,800rpm 混匀 20s，离心 5s；
- 6) 上机检测：将八联管放入 PCR 扩增仪中，设定程序，进行逆转录反应。PCR 扩增仪程序设置：25 $^{\circ}$ C 10 min；30 $^{\circ}$ C 10 min；35 $^{\circ}$ C 10 min；40 $^{\circ}$ C 10 min；95 $^{\circ}$ C 5 min；20 $^{\circ}$ C 保存；
- 7) 逆转录产物存放：逆转录产物置于冰上暂存，并在 1 小时内进行后续 PCR 扩增。如需长时间暂存，可-20 \pm 5 $^{\circ}$ C 环境中保存不超过 60 天。

4. 荧光 PCR 扩增

- 1) 试剂准备：从试剂盒中取出 PCR 反应液，反应液室温（10-30 $^{\circ}$ C）解冻后涡旋混匀 5s，取 PCR 反应液 3,749 μ L 加入到新的 15mL 离心管中，加入 3,800 μ L 无核酸酶水（需自备），涡旋混匀 5S，冰上待用；
- 2) 配置反应混合液：准备一块 96 孔深孔板置于冰上，向步骤 1) 15mL 离心管中加入 51 μ L PCR 酶，涡旋混匀 5s，转移混合液至深孔板中，每孔 435 μ L，共加两列，总计 16 孔；
- 3) 加样：将步骤 3 中的八联管（逆转录产物）离心，用排枪将全部产物按对应位置转移至深孔板中，混匀仪 1,400rpm 混匀 30s；
- 4) 转板：从试剂盒中取出引物板，离心后放置冰上，将步骤 3) 中配好的混合液用 8 道排枪转至引物板中，其中第一列转至引物板奇数行，第二列转至引物板偶数行，每行 24 孔，每孔 15 μ L。转好板后用 PCR 膜贴膜，离心；
- 5) 上机检测：将步骤 4) 中的引物板放入实时荧光定量 PCR 仪中，设定程序，进行 PCR 扩增。PCR 仪反应条件设置：选择 Properties，输入检测名称，在 Chemistry 选项卡中选择 SYBR Green Reagents；选择 Method，条件设置如图 1。

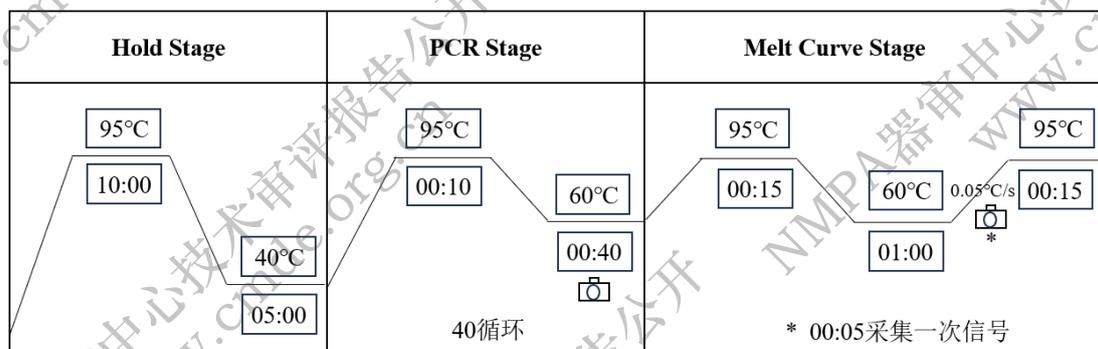


图 1 PCR 反应条件设置

5. 结果导出：在判定扩增曲线正常即呈现 S 型，且熔解曲线为单峰后，自动设置基线，手动设置阈值线为 0.4，导出数据。每个样本扩增每个基因有左右复孔，左右复孔的平均值为每个样本扩增每个基因的 CT 值。如其中一孔无正常扩增曲线既呈现非 S 型后（异常孔），复孔 CT 值为样本基因的 CT 值。

6. 数据分析处理：

1) 数据导入：将导出的原始数据导入“12 种微小核糖核酸（microRNA）检测分析软件”中相应位置，并点击“下一步”；

2) 输入参考品信息：将本次检测使用的参考品批号信息输入到分析软件中的相应位置，并点击“下一步”；

3) 输入样本信息：将本次检测的所有样本名称输入到分析软件中的相应位置，并将异常孔所在位置选择为无效孔位，点击“下一步”；

4) 分析结果：质控结果通过后，得出样本的风险值（Score），并根据设定的阈值（Cut off）进行结果判定。

【阳性判断值】

1. 使用 12 种微小核糖核酸（microRNA）检测试剂盒对临床研究血清样本进行 12 种靶标 microRNA 的检测，使用“12 种微小核糖核酸（microRNA）检测分析软件”内的风险值（Score）计算公式分析 Ct 值获得样本风险值（Score）。计算公式的基本形式为： $Score = 70 / (1 + e^{-K})$ 。其中，Score 为综合风险值， $K = -1.2153 \times CT_1 - 1.0703 \times CT_2 - 0.9010 \times CT_3 + 0.3907 \times CT_4 + 2.3878 \times CT_5 - 3.4531 \times CT_6 - 1.5187 \times CT_7 + 4.1639 \times CT_8 - 0.8619 \times CT_9 + 0.6728 \times CT_{10} - 0.5750 \times CT_{11} + 1.9865 \times CT_{12} - 4.1108$ ，e 为自然常数， $CT_1 \sim CT_{12}$ 为 G1~G12 校准后的 CT 值。为了确定最佳临界点，再用统计学上的最佳约登指数来确定合适的灵敏度和特异度所对应的 Cut off 值。使用受试者工作特征曲线（ROC）进行计算，Cut off 值为 40.0 时准确性能最优。

2. 当检测结果不符合以下要求时，该样本检测结果不合格，需重新检测。

1) 左右复孔要求：样本扩增每个基因的重复 2 个 CT 值之差不大于 1；

2) 阴性质控品和空白对照：阴性质控品和空白对照检测基因如无正常扩增曲线，则定义该基因 CT 值为 40，左右复孔检测结果 CT 值均应符合表 2 要求，表示未检测到靶基因；

表 2 阴性质控品和空白对照检测结果要求

基因	G1	G2	G3	G4	G5	G6
CT 值	≥31.0	≥31.0	≥30.5	≥30.5	≥30.5	≥31.0
基因	G7	G8	G9	G10	G11	G12
CT 值	≥31.0	≥31.0	≥31.0	≥31.0	≥31.5	≥31.0

3) 阳性质控品、参考品和检测样本：12 种微小核糖核酸检测结果 CT 值应符合表 3 要求，表示在检测范围之内；

表 3 样本检测结果要求

基因	CT 值范围	Tm 值
----	--------	------

G1	$14.0 \leq \text{CT 值} < 31.0$	79-83℃
G2	$14.0 \leq \text{CT 值} < 31.0$	77-82℃
G3	$14.0 \leq \text{CT 值} < 30.5$	78-82℃
G4	$14.0 \leq \text{CT 值} < 30.5$	79-83℃
G5	$14.0 \leq \text{CT 值} < 30.5$	78-82℃
G6	$14.0 \leq \text{CT 值} < 31.0$	77-82℃
G7	$14.0 \leq \text{CT 值} < 31.0$	78-83℃
G8	$14.0 \leq \text{CT 值} < 31.0$	77-81℃
G9	$14.0 \leq \text{CT 值} < 31.0$	78-82℃
G10	$14.0 \leq \text{CT 值} < 31.0$	77-82℃
G11	$14.0 \leq \text{CT 值} < 31.5$	76-81℃
G12	$14.0 \leq \text{CT 值} < 31.0$	78-83℃

4) 检测样本：在临床样本中，12种靶标 microRNA 的平均 CT 值表达稳定，可以通过平均 CT 值的检测对样本有效性进行评估。通过临床研究样本的检测，确定 12 种靶标 microRNA 平均 CT 值的范围要求如表 4 所述。

表 4 样本检测结果要求

样本 CT 平均值	
平均值上限	25.8
平均值下限	21.1

【检验结果的解释】

1. 阳性结果：当检测样本风险值 (Score) >40.0，则该样本检测结果为阳性，提示胃癌和/或高级别上皮内瘤变风险较高，建议通过胃镜或其他临床诊断方法进一步确诊。
2. 阴性结果：当检测样本风险值 ≤ 40.0 则该样本检测结果为阴性，提示胃癌和/或高级别上皮内瘤变风险较低，但不排除疾病的风险。
3. 无效结果：当检测结果不符合检测要求时，检测结果无效，需重新检测。
 - 1) 若样本左右复孔 CT 值之差大于 1，提示可能此次检测过程中此基因存在污染或操作偏差，建议此样本重新检测；
 - 2) 若空白对照 12 个基因的 CT 值中有异常数据，阴性质控品数据正常，提示可能样本提取过程中存在污染，建议重新进行样本提取；若阴性质控品 12 个基因的 CT 值中有异常数据，空白对照数据正常，提示试剂盒可能失效；如空白对照和阴性质控品中均有异常数据，提示可能检测过程中存在污染；
 - 3) 若阳性质控品 12 个基因的 CT 值中有异常数据，提示可能试剂盒性能失效，应更换试剂盒；若参考品 12 个基因的 CT 值中有异常数据，可能操作过程或设备存在问题，或者试剂盒性能变差，建议再次检测；若检测样本 12 个基因的 CT 值中有异常数据，可能样本发生降解或污染，建议重新提取，如重新检测后仍不符合要求，可能样本基因含量较低，不符合检测范围；
 - 4) 若检测样本 12 个基因的平均 CT 值异常，可能样本保存过程中存在降解或溶血，建议重新采

样后进行检测。

【检验方法的局限性】

1. 检测结果仅供临床参考，对于患者的确诊及治疗方法的选择应结合其症状体征、其他检查及治疗反应等情况综合考虑。
2. 本试剂盒结果会受到样本来源、采集过程、质量、运输条件、预处理等因素影响，同时也受到 RNA 提取质量、设备型号、操作环境等限制，可能导致得出假阳性或假阴性的检测结果。使用者须严格按照说明书进行操作。
3. 扩增产物的污染和核酸提取中标本的交叉污染，也很容易出现假阳性或假阴性的结果。临床实验室应严格按照《临床基因扩增实验室工作规范》配备设备及操作人员，必须要有严格的实验室区分、实验管理和质量控制措施。
4. 本试剂盒不能替代胃镜。对于高风险患者，如果检测结果阴性，不能免于后续胃镜检查。
5. 本产品对胃癌和高级别上皮内瘤变均存在漏检风险，尤其对高级别上皮内瘤变漏检风险较大，检测阴性样本应考虑患者其他临床表现和高危因素以确定是否采取进一步的检测或治疗手段。

【产品性能指标】

1. 阴性参考品符合率：检测企业阴性参考品 N1-N8、企业靶标阴性参考品 N9，阴性参考品符合率应为 100%。
2. 阳性参考品符合率：检测企业阳性参考品 P1-P6、企业靶标阳性参考品 P7-P8，阳性参考品符合率应为 100%。
3. 精密度：检测高、低 2 个浓度水平的企业精密度参考品 J1、J2 各 10 次，每个基因 CT 值的变异系数 (CV, %) $\leq 5\%$ ；检测企业精密度强阳性参考品、企业精密度弱阳性参考品和企业精密度阴性参考品，计算联合检测风险值结果均符合标准要求。
4. 检测限：血清样本中每个靶标基因最低检测限为 5×10^2 拷贝/ μL （提取后 RNA 浓度为 2×10^3 拷贝/ μL ）。
5. 空白限：检测企业空白限参考品，每个基因 CT 值符合表 3 要求。
6. 其他干扰：干扰试验显示，样本中含有以下干扰物：血红蛋白 (10mg/mL)、白蛋白 (50mg/mL)、胆红素 (0.15mg/mL)、甘油三酯 (5mg/mL)、胆固醇 (2.5mg/mL)、葡萄糖 (1.2mg/mL)、尿酸 (0.09mg/mL)、卡托普利 (5 $\mu\text{g/mL}$)、奥美拉唑 (6 $\mu\text{g/mL}$)、西咪替丁 (0.02mg/mL)、多潘立酮 (0.04 $\mu\text{g/mL}$)、阿莫西林 (0.08mg/mL)、维生素 C (0.06mg/mL)、盐酸二甲双胍片 (0.02mg/mL)、阿司匹林 (0.6mg/mL)、对乙酰氨基酚 (0.2mg/mL)，对检测结果无影响。
7. 交叉反应：交叉试验显示，检测靶标的同源序列 microRNA 对检测结果无影响；消化道癌症（肝癌、结直肠癌、食管癌）和非消化道癌症（肺癌、乳腺癌、甲状腺癌），观察到阳性检测结果，但整体特异性符合产品性能要求。
8. 临床性能：在 7 家临床试验机构进行临床试验，共纳入 9144 例病例，本试剂盒对胃癌的灵敏度为 84.73%，高级别上皮内瘤变的灵敏度为 56%，特异度为 78.57%；针对前瞻性样本检测结果胃癌的灵敏度为 81.54%，高级别上皮内瘤变的灵敏度为 57.89%，特异度为 78.27%。

【注意事项】

1. 本试剂盒的操作人员应经过专业培训并具有一定经验。
2. 实验前应提前把相应试剂从冰箱取出置于冰上解冻。
3. 本试剂盒为一次性使用。
4. 样本应按传染性物质对待，操作过程中注意样本管漏液及手套破损，如遇相关情况，按实验

室相关规范进行处理。

5. 为避免试剂吸取过程中意外喷溅等原因造成的试验区污染，建议使用前混匀并短暂离心。
6. 为防止荧光干扰，引物板封膜上避免用手直接接触，勿在膜上做任何标记。
7. 产品使用过程应使用校准过的量器，如移液枪。
8. 引物板在仪器运行完毕之后及时取出，并应按照实验室相关规范进行处理防止污染。
9. 本试剂盒仅供体外诊断使用。
10. 使用过程中应注意产品批号及产品有效期，避免使用过期产品及避免不同批号试剂组分混用。

【标识的解释】

参	 查阅使用说明书	IVD	体外诊断医疗器械	 温度极限
---	---	-----	----------	--

【参考文献】

1. Lu J, Getz G, Miska E A, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. Nature, 2005;435(7043):834-838.
2. Wei H, Pu K, Liu X-G, et al. The diagnostic value of circulating microRNAs as a biomarker for gastric cancer: a meta-analysis[J]. Oncol Rep, 2019;41:87-102.
3. Shigeyasu K, Toden S, Zumwalt TJ, et al. Emerging role of microRNAs as liquid biopsy biomarkers in gastrointestinal cancers[J]. Clin Cancer Res, 2017; 23:2391-2399.
4. Lü, T. X. & Rothenberg, M. E. MicroRNA[J]. J. Allergy Clin. Immunol. 2018;141, 1202-1207.
5. Hong LZ, Zhou L, Zou R, et al.. Systematic evaluation of multiple qPCR platforms, NanoString and miRNA-Seq for microRNA biomarker discovery in human biofluids[J]. Sci Rep. 2021;24;11(1):4435-4445.
6. Kapoor R , Zhu F , Koh C , et al. Upper GI cancer Development and validation of a serum microRNA biomarker panel for detecting gastric cancer in a high-risk population[J]. Gut, 2020;0:1-9.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：杭州觅因生物科技有限公司

注册人/生产企业住所：浙江省杭州经济技术开发区 6 号大街 260 号 18 幢五层

联系方式：

售后服务单位名称：杭州觅因生物科技有限公司

联系方式：

生产地址：

浙江省杭州经济技术开发区 6 号大街 260 号 18 幢五层

浙江省杭州市钱塘新区 6 号大街 260 号 3 幢 103、105 室

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】

批准日期/生效日期：

修改日期：