

受理号：CSZ2300408

# 体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称： 4种微小核糖核酸（microRNA）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： 康德（深圳）生物技术有限公司

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 .....	7
三、 临床评价概述 .....	11
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

康德（深圳）生物技术有限公司

### 二、申请人住所

深圳市南山区粤海街道麻岭社区麻雀岭工业区 M-6 栋中钢大厦  
201

### 三、生产地址

深圳市南山区粤海街道麻岭社区麻雀岭工业区 M-6 栋中钢大厦  
201

# 技术审评概述

## 一、产品概述

### (一) 产品主要组成成分

本产品包含A盒和B盒，主要组成见表1和表2：

表1. 试剂盒A盒组成

序号	组分	主要成分	规格及装量
A1	RNAiso Blood (裂解液)	苯酚	50mL×1 管

表2. 试剂盒B盒组成

序号	组分	主要成分	规格及装量
B1	RT Primer Mix I (反转录引物预混液 I)	U6 与 hsa-miR-132-3p 特异性反转录引物	30μL×1 管
B2	RT Primer Mix II (反转录引物预混液 II)	U6 与 hsa-miR-30c-5p 特异性反转录引物	30μL×1 管
B3	RT Primer Mix III (反转录引物预混液 III)	U6 与 hsa-miR-24-3p 特异性反转录引物	30μL×1 管
B4	RT Primer Mix IV (反转录引物预混液 IV)	U6 与 hsa-miR-23a-3p 特异性反转录引物	30μL×1 管
B5	gDNA Eraser (DNA 分解酶)	DNA 分解酶	120μL×1 管
B6	5×gDNA Eraser Buffer (5×DNA 分解反应缓冲液)	DNA 分解反应缓冲液	240μL×1 管
B7	RT Enzyme Mix (反转录酶预混液)	反转录酶, RNase Inhibitor	120μL×1 管
B8	5×RT Buffer (5×反转录缓冲液)	dNTP Mixture	440μL×1 管
B9	qPCR Primer & Probe Mix I (qPCR 引物探针预混液)	U6 与 hsa-miR-132-3p 上、下游引物及探针	60μL×1 管

B10	qPCR Primer & Probe Mix II (qPCR 引物探针预混液)	U6 与 hsa-miR-30c-5p 上、下游引物及探针	60μL×1 管
B11	qPCR Primer & Probe Mix III (qPCR 引物探针预混液)	U6 与 hsa-miR-24-3p 上、下游引物及探针	60μL×1 管
B12	qPCR Primer & Probe Mix IV (qPCR 引物探针预混液)	U6 与 hsa-miR-23a-3p 上、下游引物及探针	60μL×1 管
B13	Probe qPCR Mix (探针法 qPCR 预混液)	PCR 酶, dNTP Mixture, Mg <sup>2+</sup> 等	1.2mL×1 管
B14	RNase-free H <sub>2</sub> O (无核酸酶 水)	无核酸酶无菌水	3mL×1 管
B15	阳性对照品	人工血清、人工合成的 4 种 miRNA 及	1mL×1 管
B16	阴性对照品	人工血清、人工合成的 U6	1mL×1 管

注意：不同批号的组分不可以互换或混用。

具体内容详见说明书。

## (二) 产品预期用途

本产品用于检测人血清样本中四种微小核糖核酸分子 hsa-miR-132-3p、hsa-miR-30c-5p、hsa-miR-24-3p 和 hsa-miR-23a-3p，通过公式计算诊断指标 Dx 值，用于疑似胰腺癌患者的辅助诊断。

本试剂盒检测结果阳性不作为胰腺癌临床确诊的唯一依据，检测结果阴性也不能完全排除胰腺癌的可能性，临床医生应该结合患者病情及其他实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。该检测不用于肿瘤筛查。

## (三) 产品包装规格

50 人份/盒。

## (四) 产品检验原理

本产品采用多重荧光探针的方法，检测 4 种在胰腺癌中异常高表达的 miRNA 作为胰腺癌的诊断标志物。检测过程可分为总 RNA (Total RNA) 的提取、反转录反应、PCR 扩增及荧光检测三部分。

**Total RNA 的提取：**血清样品在 RNAiso Blood 中裂解后，再加入氯仿充分混合后离心。离心后溶液会形成透明上清层、中间层和下层有机层。RNA 分布在上清层中，收集上清层，经异丙醇沉淀便可以回收得到 Total RNA。

**反转录：**从血清中提取的 Total RNA 中常常混有基因组 DNA，需要先使用具有较强 DNA 分解活性的 DNA 分解酶 (gDNA Eraser) 去基因组 DNA。处理后的 Total RNA 作为模板经反转录反应合成 cDNA。由于 miRNA 长度短，本产品使用茎环法对 4 种 miRNA 及内参 U6-1 设计了特异性茎环结构的反转录引物，该引物 3'C 端有 6 个碱基与成熟 miRNA 的 3'C 端互补配对，反转录合成第一链 cDNA。

**PCR 扩增及荧光检测：**本产品使用多重探针法进行荧光定量检测。分别对 4 种 miRNA 及内参设计特异性茎环引物及 Taqman 探针，该探针能分别与引物扩增区域中间的一段 DNA 模板发生特异性结合，在 PCR 延伸反应过程中，Taq 酶的外切酶活性将 5'端荧光基团从探针上切割下来，使之游离于反应体系中，从而脱离了 3'端荧光淬灭基团的屏蔽，即能接受光刺激而发出可供仪器检测的荧光，从而实现 miRNA 的检测。通过对内参 U6-1 和 4 种 miRNA 标记不同的荧光基团，使得内参 U6-1 与靶标 miRNA 能在同一体系中进行反应实现多重荧光探针检测，避免了内参和靶标分开检测

引起的误差。

## 二、临床前研究概述

### (一) 主要原材料

本产品主要原材料包括：引物、探针、酶（DNA 分解酶、反转录酶、DNA 聚合酶等）、人工合成的 4 种 miRNA 及 U6。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。

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、检出限参考品和精密度参考品。

阳性参考品 14 份，分别命名为 P1 ~ P14，其中阳性参考品 P1 ~ P4 和 P13 ~ P14 为不同浓度的人工合成四种 miRNA 的溶液，P5 ~ P12 为不同病理分期的胰腺癌病人血清。

阴性参考品 14 份，分别命名为 N1 ~ N14，其中 N1 为胰腺癌阴性人血清，N2 ~ N4 和 N10 ~ N14 为交叉反应病人血清，N5 ~ N9 为干扰物质样本。

精密度参考品 2 份，为不同浓度的胰腺癌病人血清。

检出限参考品 1 份，为含人工合成的四种 miRNA 及 U6 的阴性人血清。

本试剂盒设置了阴阳性对照品，其中阴性对照品为人工合成的 U6 溶液；阳性对照品为人工合成的 4 种 miRNA 及 U6 溶液，对试剂盒的性能、仪器性能、样本质量、实验环境及操作进行监测，

确保样品检测结果准确可靠。

## (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，包括核酸提取反应体系和反应条件、去除基因组 DNA 的反应体系和反应条件、反转录过程的反应体系和反应条件、PCR 扩增反应体系及反应条件，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

本试剂盒分析性能评估主要包括：核酸提取性能、适用的样本类型、准确度、精密度、分析特异性、检出限等，申请人提交了质量管理体系下生产的三批产品在适用机型上的性能评估资料。

### 1. 核酸提取性能

对配合使用的核酸提取试剂进行了提取效率研究，结果表明核酸提取效率符合检测要求。

### 2. 适用的样本类型

申请人使用了 3 种不含抗凝剂的采血管分别收集 3 个志愿者的血液，试验结果表明 3 种采血管的检测结果显示无显著差异，均可以用于本检测。

### 3. 准确度

(1) 在准确度研究中，申请人采用三批试剂盒对企业参考

品及临床样本在适用机型上进行准确度评价。结果表明检测企业参考品阴性符合率为 100%，阳性符合率为 100%；

(2) 检测临床样本，与临床病理检测结果符合率为 100%，特别对检出限水平的临床样本进行了准确度研究，与临床病理检测结果符合率为 100%；

(3) 申请人还采用临床样本与数字 PCR 进行方法学比对，结果表明试剂盒检测结果与数字 PCR 检测结果一致。

#### 4. 精密度

精密度研究中，申请人使用三批试剂对临床样本进行了重复性研究 (n=20)，CV 均  $\leq 10\%$ 。然后在相同测量程序、相同地点用三批试剂盒对临床样本在 20 天内重复测量，得到操作者间精密度、设备间精密度、日内和日间精密度、批间精密度，CV 均  $\leq 10\%$ 。申请人还在不同地点、不同操作者、不同仪器的测量条件下用三批试剂盒检测临床样本，连续进行 5 天，每天检测 2 次，得到三个批次试剂的再现性，CV 均  $\leq 10\%$ 。

#### 5. 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。

在交叉反应性能评估中，申请人使用三批试剂对具有相同或相似的临床症状的人群、其他消化道癌症患者、血液肿瘤中肿瘤高表达样本及四种 microRNA 序列类似物进行交叉反应评价，结果表明试剂盒对慢性胰腺炎、导管内乳头状黏液瘤 (IPMN)、实性假乳头状瘤 (SPN)、糖尿病、肥胖症、肝癌、胃癌、肠癌、食

管癌、鳞癌、肾癌、前列腺炎、胃炎、肾炎、白血病、多发性骨髓瘤、恶性淋巴瘤相关疾病病人血清及四种 microRNA 序列类似物不存在交叉反应。

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：胆红素（0.2mg/mL）、血红蛋白（10mg/mL）、甘油三酯（12 mg/mL）、胆固醇（5 mg/mL）、ANA（100AU/mL）、RF（60IU/mL）、吉西他滨（20 μg/mL）、5-氟尿嘧啶（50 μg/mL）对检测结果没有影响。

#### 6. 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 miRNA 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，并以接近检出限的样本进行验证，结果表明试剂盒的检出限为  $1 \times 10^3 \text{copies}/\mu\text{L}$ 。

#### （四）阳性判断值研究

申请人收集来自临床机构的血液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 358 例样本（包括 138 例阳性样本，220 例阴性样本），采用 ROC 曲线的方法进行研究，采用临床病理学诊断结果确认样本的性质。通过统计分析，阳性判断值为： $D_x=0.62$ 。另外纳入 171 例样本进行阳性判断值的验证，结果显示基于前述建立的阳性判断值进行结果统计分析，检测结果与对照方法的阳性符合率均为 100%，阴性符合率为 99.1%。结果表明本试剂盒阳性判断值设置合理。

同时采用上述样本对内标阳性判断值进行研究和验证，确定内标 U6 的 Ct 值  $\leq 34$  为样本检测有效性质量控制标准。

### **(五) 稳定性研究**

申请人对本产品的实时稳定性、开封稳定性、冻融稳定性、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 个月、1 个月、2 个月……直至第 13 个月进行稳定性试验；检测结果均符合技术要求。因此，试剂盒按照说明书要求可保存 12 个月。

此外，申请人对产品的开封稳定性、冻融稳定性、运输稳定性和样本稳定性(包括实时稳定性和冻融稳定性)分别进行了研究，结果显示，产品的性能均满足产品说明书声称的要求。

## **三、临床评价概述**

申请人在中国医学科学院北京协和医院、中南大学湘雅二医院、大连医科大学附属第一医院和海军军医大学第一附属医院共四家临床机构完成了临床试验。采用试验体外诊断试剂与胰腺癌临床参考标准进行比较研究，对产品临床性能进行评价。入组病例主要为疑似胰腺癌的患者。样本类型为血清样本。临床试验共入组受试者 958 例，其中临床参考方法确认胰腺癌病例 334 例，非胰腺癌病例 624 例；临床确诊为胰腺癌的病例中包括胰腺导管腺癌 332 例、神经内分泌肿瘤 32 例、腺泡细胞癌 2 例；入组病例

包括 I 期病例 109 例、II 期病例 114 例、III 期病例 54 例，IV 期病例 36 例、分期不明病例 21 例，原位癌 24 例。临床试验还入组肠癌、胃癌、肝癌等其他消化道肿瘤共 170 例，其他非消化道系统恶性肿瘤共 41 例。试验结果显示，本产品与临床参考标准相比，临床灵敏度为 94.91% (95%CI: 92.00%, 96.80%)，临床特异度为 97.12% (95%CI: 95.49%, 98.17%)。

此外，申请人在三家临床检测机构开展了试验体外诊断试剂与数字 PCR 方法进行比较研究，确认本产品的临床检测性能。试验结果显示：每种 microRNA 检测的  $\Delta Ct$  值与数字 PCR 检测的拷贝数均具有相关性，本产品临床检测性能满足要求。

另外，采用试验体外诊断试剂对 41 例胰腺癌患者手术前后的样本进行连续检测，40 例患者术前检测结果为阳性，术后检测结果为阴性；1 例患者术前术后检测结果均为阴性；表明胰腺癌手术切除后血清中 microRNA 水平降低。

综上所述，临床试验资料符合技术审评要求。

#### 四、产品受益风险判定

本产品根据 YY/T 0316-2016 《医疗器械风险管理对医疗器械的应用》进行风险分析。

##### (一) 受益评估

本产品用于检测人血清样本中四种微小核糖核酸分子 hsa-miR-132-3p、hsa-miR-30c-5p、hsa-miR-24-3p 和 hsa-miR-23a-3p，通过公式计算诊断指标 Dx 值，用于疑似胰腺癌患者的辅助诊

断。

本试剂盒检测结果阳性不作为胰腺癌临床确诊的唯一依据，检测结果阴性也不能完全排除胰腺癌的可能性，临床医生应该结合患者病情及其他实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。该检测不用于肿瘤筛查。其临床应用的主要受益在于：该产品可以为疑似胰腺癌的早期辅助诊断提供多一种无创性检测方法。

## （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，对合理可行降低的风险、不经过风险/收益分析即判定为不可接受的风险采取控制措施，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。但为保证用械安全，基于对主要剩余风险的规避，需要在说明书中提示以下信息：

1. 与预期用途有关的风险，该产品存在假阳性和假阴性的可能，说明书中已明确检测结果不能作为临床诊断的唯一依据，检测结果阴性也不能完全排除胰腺癌的可能性，需结合临床进一步评估。临床上应结合病例超声等其他诊断及检测方法进一步确认病例。

2. 与储存或运输相关的风险，例如产品储存条件不达标，产品运输条件不达标。

3. 与使用有关的风险，例如样本的采集、转运以及操作错误，可能出现假阴性结果。容器不洁、试剂污染，可能出现假阳性结

果。可能由于样本损坏等原因无法测定而需要重新收集样本。

4. 与防护有关的风险，不同操作步骤需在指定区域进行。实验室区域设计参考《医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则》。试剂盒剩余试剂及使用过程中产生的废物、废液按照医疗废弃物的处理方式进行处理

5. 警示及注意事项：该试剂盒说明书中明确了该试剂盒检查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 7 月 8 日

附件: 产品说明书

## 4种微小核糖核酸（microRNA）检测试剂盒（PCR 荧光探针法）说明书

### 【产品名称】

4种微小核糖核酸（microRNA）检测试剂盒（PCR 荧光探针法）

### 【包装规格】

50 人份/盒

### 【预期用途】

本产品用于检测人血清样本中的四种微小核糖核酸分子hsa-miR-132-3p、hsa-miR-30c-5p、hsa-miR-24-3p和hsa-miR-23a-3p，通过公式计算诊断指标Dx值，用于疑似胰腺癌患者的辅助诊断。

本试剂盒检测结果阳性不作为胰腺癌临床确诊的唯一依据，检测结果阴性也不能完全排除胰腺癌的可能性，临床医生应该结合患者病情及其他实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。该检测不用于肿瘤筛查。

胰腺癌是一种高度恶性肿瘤，发病率和死亡率呈逐年上升趋势。目前手术切除仍是胰腺癌治疗的主要手段。但由于胰腺癌病变无明显表征，很难实现精准诊断，约80-85%的患者在确诊时已属于中晚期无法进行手术切除，使得其5年生存率仅为10%。因此，胰腺癌的诊断是有效治疗胰腺癌、改善预后的关键。影像学方法诸如B超、计算机断层扫描(CT)、磁共振成像(MRI)、内镜超声(EUS)和正电子发射断层扫描(PET)是临床应用较为广泛的胰腺癌诊断手段。

### 【检验原理】

本产品采用多重荧光探针的方法，检测4种在胰腺癌中异常高表达的miRNA作为胰腺癌的诊断标志物。检测过程可分为总RNA的提取、反转录反应、PCR扩增及荧光检测三部分。

1. 总RNA 的提取：血清样品在RNAiso Blood 中裂解后，再加入氯仿充分混合后离心。离心后溶液会形成透明上清层、中间层和下层有机层。RNA 分布在上清层中，收集上清层，经异丙醇沉淀便可以回收得到总 RNA。

2. 反转录：从血清中提取的总RNA中常常混有基因组DNA，需要先使用具有较强DNA 分解活性的gDNA Eraser去基因组 DNA。处理后的总RNA作为模板经反转录反应合成cDNA。由于miRNA长度短，本产品使用茎环法对4种miRNA及内参U6-1设计了特异性茎环结构的反转录引物，该引物3'C端有6个碱基与成熟miRNA的3'C端互补配对，反转录合成第一链cDNA。

3. PCR扩增及荧光检测：本产品使用多重探针法进行荧光定量检测。分别对4种miRNA

及内参设计特异性茎环引物及 Taqman 探针，该探针能分别与引物扩增区域中间的一段DNA模板发生特异性结合，在 PCR 延伸反应过程中，Taq 酶的外切酶活性将 5'端荧光基团从探针上切割下来，使之游离于反应体系中，从而脱离了3'端荧光淬灭基团的屏蔽，即能接受光刺激而发出可供仪器检测的荧光，从而实现对miRNA的检测。通过对内参U6-1和4种miRNA标记不同的荧光基团，使得内参U6-1与靶标miRNA能在同一体系中进行反应实现多重荧光探针检测，避免了内参和靶标分开检测引起的误差。

### 【主要组成成分】

本产品包含A盒和B盒，主要组成见表1和表2。

表1. 试剂盒A盒组成

序号	组分	主要成分	规格及装量
A1	RNAiso Blood (裂解)	苯酚	50mL×1 管

注：RNAiso Blood 吸入有害，使用时请在通风橱中操作。应避免与皮肤、衣物等接触。若不小心接触到眼睛或皮肤时，请立即用水冲洗后到医院进行处理。

表2. 试剂盒B盒组成

序号	组分	主要成分	规格及装量
B1	RT Primer Mix I (反转录引物预混液 I)	U6 与 hsa-miR-132-3p 特异性反转录引物	30μL×1 管
B2	RT Primer Mix II (反转录引物预混液 II)	U6 与 hsa-miR-30c-5p 特异性反转录引物	30μL×1 管
B3	RT Primer Mix III (反转录引物预混液 III)	U6 与 hsa-miR-24-3p 特异性反转录引物	30μL×1 管
B4	RT Primer Mix IV (反转录引物预混液 IV)	U6 与 hsa-miR-23a-3p 特异性反转录引物	30μL×1 管
B5	gDNA Eraser (DNA 分解酶)	DNA 分解酶	120μL×1 管
B6	5×gDNA Eraser Buffer (5×DNA 分解反应缓冲液)	DNA 分解反应缓冲液	240μL×1 管
B7	RT Enzyme Mix (反转录酶预混液)	反转录酶, RNase Inhibitor	120μL×1 管
B8	5×RT Buffer (5×反转录缓冲液)	dNTP Mixture	440μL×1 管
B9	qPCR Primer & Probe Mix I (qPCR 引物探针预混液 I)	U6 与 hsa-miR-132-3p 上、下游引物及探针	60μL×1 管
B10	qPCR Primer & Probe Mix II (qPCR 引物探针预混液 II)	U6 与 hsa-miR-30c-5p 上、下游引物及探针	60μL×1 管

B11	qPCR Primer & Probe Mix III (qPCR 引物探针预混液)	U6 与 hsa-miR-24-3p 上、下游引物及探针	60 $\mu$ L $\times$ 1 管
B12	qPCR Primer & Probe Mix IV (qPCR 引物探针预混液)	U6 与 hsa-miR-23a-3p 上、下游引物及探针	60 $\mu$ L $\times$ 1 管
B13	Probe qPCR Mix (探针法 qPCR 预混液)	PCR 酶, dNTP Mixture, Mg <sup>2+</sup> 等	1.2mL $\times$ 1 管
B14	RNase-free H <sub>2</sub> O (无核酸酶水)	无核酸酶无菌水	3mL $\times$ 1 管
B15	阳性对照品	人工血清、人工合成的 4 种 miRNA 及	1mL $\times$ 1 管
B16	阴性对照品	人工血清、人工合成的 U6	1mL $\times$ 1 管

注意：不同批号的组分不可以互换或混用。

自备设备及试剂耗材(包括但不限于)：通风橱、基因扩增仪、冷冻高速离心机、超微量分光光度计或具有超微量检测功能的酶标仪、掌上离心机、涡旋混匀仪、移液器。氯仿(分析纯)、异丙醇(分析纯)、75%乙醇(无水乙醇,分析纯,用 RNase-free H<sub>2</sub>O 配制)、200  $\mu$ L PCR 管、96 孔 PCR 板及封板膜(适用于 Roche LightCycler 480 II)、1.5mL 离心管(RNase-free, 无菌)、吸头(RNase-free, 无菌)。

#### 【储存条件及有效期】

1. A盒2~8 $^{\circ}$ C避光保存、B盒-20 $^{\circ}$ C $\pm$ 5 $^{\circ}$ C避光保存,有效期12个月。
2. 试剂盒B盒反复冻融不超过5次。
3. 试剂开瓶后,A盒2~8 $^{\circ}$ C避光保存、B盒-20 $^{\circ}$ C $\pm$ 5 $^{\circ}$ C避光保存,应在6个月内使用。
4. 生产日期和有效期见产品标签。

#### 【适用仪器】

Roche LightCycler 480 II 实时荧光定量 PCR 仪。

#### 【样本要求】

1. 样本类型：血清。
2. 样本采集及处理：用无菌注射器抽取受检者外周血 3~5mL到不含抗凝剂的采血管内,室温下自然凝集40~60min,待血液自然凝固,凝固后放入4 $^{\circ}$ C冰箱中暂存,然后在4 $^{\circ}$ C,3000rpm下离心10min,得到血清,在不干扰中间血沉棕黄层的条件下将上层血清转移到新管中(锥形底部)供检测使用。

3. 样本保存：2~8℃保存，不超过72小时；-20℃±5℃保存，不超过6个月；-70℃以下保存不超过2年。

4. 样本运输：2~8℃冰盒密封或冷链运输，运输时间不超过72小时。

### 【检验方法】

#### 1. 实验前准备（试剂准备区）：

- a. 佩戴一次性手套和口罩进行所有试剂配制和实验操作。
- b. 将冷冻保存的试剂取出置于冰上融化。
- c. 配制75%乙醇：取75mL无水乙醇（分析纯），加入RNase-free H<sub>2</sub>O定容至100mL。

#### 2. 总RNA 的提取(样本处理区)：

- a. 将待检样本及阳性对照品、阴性对照品各取250 μL分别加入到1.5mL离心管中，添加750 μL RNAiso Blood，涡旋或者移液枪上下吸打混匀，形成匀浆裂解液，室温静置5分钟。
- b. 向匀浆裂解液中加入200 μL氯仿，盖紧离心管盖，混合至溶液乳化呈乳白色，室温静置5分钟。
- c. 静置后12,000×g、4℃离心15分钟，从离心机中小心取出离心管，此时匀浆液分为三层，即：无色的上清液（含RNA）、中间白色蛋白层（大部分为 DNA）及带有颜色的下层有机层。
- d. 吸取上清液移至新的离心管中（切勿吸出白色中间层）。
- e. 向上清中加入等量体积的异丙醇，上下颠倒离心管充分混匀后，室温下静置10分钟。
- f. 静置后12,000×g、4℃离心10分钟。
- g. 弃上清，加入1mL的75%乙醇混匀，7,500×g、4℃离心5分钟，弃上清。
- h. 打开管盖室温自然晾干。干燥后，加入20μL的 RNase-free H<sub>2</sub>O溶解RNA。（注意：不可以离心或加热干燥，否则RNA将会很难溶解。）

#### 3. 反转录（核酸扩增区）

- a. 去除基因组DNA。反应液配制请在冰上进行，每例样本按表3配制反应液，为了保证反应液配制的准确性，应先按总反应数配制，再分装到每个反应管中，最后加入RNA样品。

表3. 去除基因组DNA反应液的配制

试剂	使用量 (μL)
RNA	14.0
gDNA Eraser	2.0
5×gDNA Eraser Buffer	4.0
Total	20.0

在基因扩增仪中进行以下程序：42℃，2 min→4℃。

- b. 反转录反应。反应液配制请在冰上进行，每例样本的每个miRNA反转录反应液按表4配制，为了保证反应液配制的准确性，应先按总反应数配制，再分装到每个反应管中。轻柔混匀后立即进行反转录反应。

表4. 反转录反应液的配制

试剂	使用量 (μL)
步骤 a 的反应液	5.0
RT Enzyme Mix	0.5
5×RT Buffer	2.0
RT Primer Mix I (或 II/III/IV)	0.5
RNase-free H <sub>2</sub> O	2.0
Total	10.0

在热循环仪中进行以下程序：42℃ 15min→85℃ 5sec→4℃。

#### 4. PCR 扩增及荧光检测（核酸扩增区）

- a. 反应液配制请在冰上进行。每例样本的每个miRNA PCR扩增反应液按表5配制，为了保证反应液配制的准确性，应先按总反应数配制，再分装到每个反应管中。

表5. 荧光定量 PCR 反应液的配制

试剂	使用量 (μL)
Probe qPCR Mix (2×)	5.0
qPCR Primer & Probe Mix I (或 II/III/IV)	1.0
cDNA	1.0
RNase-free H <sub>2</sub> O	3.0
Total	10.0

- b. 在Roche LightCycler 480 II荧光定量PCR仪中按表6建立反应程序，荧光通道选择Fam和VIC两个通道（Fam通道采集U6的荧光值，VIC通道采集4种miRNA的荧光值）。

表 6. 荧光定量 PCR 反应程序

反应阶段	温度	时间	循环数	信号
预变性	95℃	30 sec	1	\
PCR 扩增	95℃	5 sec	45	\
	60℃	30 sec		收集信号

#### 5. 结果分析:

a. 反应结束后使用Roche LightCycler 480 II荧光定量PCR仪的二阶最大求导法分析功能自动生成Ct值。扩增曲线一般呈 S 型。如有必要可根据实验情况使用Fit Points点拟合法调节基线和阈值，选择荧光本底值较稳定的一段区域作为基线的设定范围。

b.  $\Delta Ct$ 值的计算: 荧光定量PCR仪得到4种miRNA及U6的Ct值, 分别计算每个样本4种miRNA与U6的Ct差值, 即 $\Delta Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{U6}$ 。

c. 诊断指标 (Dx) 的计算: 按照以下公式计算每个被检样本的诊断指标值:

$Dx = e^y / (1 + e^y)$ ,  $y = -0.474 \times X_1 - 0.550 \times X_2 - 0.338 \times X_3 - 0.741 \times X_4 - 6.586$ , 其中,  $X_1$ 为hsa-miR-132-3p的 $\Delta Ct$ 值,  $X_2$ 为hsa-miR-30c-5p的 $\Delta Ct$ 值,  $X_3$ 为hsa-miR-24-3p的 $\Delta Ct$ 值,  $X_4$ 为hsa-miR-23a-3p的 $\Delta Ct$ 值。直接检测结果不能直接作为临床确诊或排除病例的依据, 但是通过数据分析得出的胰腺癌诊断指标Dx可作为临床确诊依据, 供临床医生参考使用。

#### 6. 质量控制:

阴性与阳性对照品需与待检样本一起检测, 检测结果需满足: 对照品U6的Ct值都应 $\leq 34$ , 且阴性对照品Dx  $< 0.62$ , 阳性对照品Dx  $\geq 0.62$ 。

##### 【阳性判断值】

诊断指标Dx  $\geq 0.62$ 作为胰腺癌阳性的判断值, 反之为阴性。

##### 【检验结果的解释】

a. 被检样本U6的 Ct 值都应 $\leq 34$ , 并有对数增长曲线。否则, 检测结果无效, 需重复检测。

b. 当样本诊断指标Dx  $< 0.62$  时, 则该样本为阴性。

c. 当样本诊断指标Dx  $\geq 0.62$  时, 则该样本为阳性。

##### 【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒检测结果仅作为临床诊断辅助手段之一, 仅供临床参考, 对患者的临床诊治应结

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。

2. 不合理的样本采集、转运及处理都有可能导致检测结果错误。
3. 样本的采集、转运以及操作错误，可能出现假阴性结果。
4. 容器不洁、试剂污染，可能出现假阳性结果。
5. 可能由于样本损坏等原因无法测定而需要重新收集样本。

#### 【产品性能指标】

1. 阳性符合率：检测企业阳性参考品，结果均为阳性。
2. 阴性符合率：检测企业阴性参考品，结果均为阴性。
3. 检出限：检测企业检出限参考品，检出为阳性。
4. 检出限量值： $10^3$ copies/ $\mu$ L
5. 精密度：重复检测企业精密度参考品，4种miRNA检测的Ct值的变异系数 $CV \leq 10\%$ ；在相同测量程序、相同地点用三批试剂盒对三个临床样本在20天内重复测量，得到操作者间精密度、设备间精密度、日内和日间精密度、批间精密度， $CV$ 均 $\leq 10\%$ 。在不同地点、不同操作者、不同仪器的测量条件下用三批试剂盒检测三个样本,连续进行5天,每天检测2次，得到三个批次试剂的再现性， $CV$ 均 $\leq 10\%$ 。

#### 6. 特异性：

交叉反应：以此试剂盒检测慢性胰腺炎、导管内乳头状黏液瘤(IPMN)、实性假乳头状瘤(SPN)、糖尿病、肥胖症、肝癌、胃癌、肠癌、食管癌、鳞癌、肾癌、前列腺炎、胃炎、肾炎、白血病、多发性骨髓瘤、恶性淋巴瘤相关疾病病人血清样本及四种 microRNA 序列类似物，检测结果为阴性。

- 1) 干扰物质：干扰实验显示，样本中含有以下干扰物质：胆红素（0.2mg/mL）、血红蛋白（10mg/mL）、甘油三酯（12 mg/mL）、胆固醇（5 mg/mL）、ANA（100AU/mL）、RF（60IU/mL）吉西他滨（20 $\mu$ g/mL）、5-氟尿嘧啶（50 $\mu$ g/mL）对检测结果没有影响。

7. 临床评价：本产品四家临床检测机构开展了临床试验，共纳入病例958例，与胰腺癌临床参考标准进行比较研究，灵敏度为94.91%，特异度为97.12%，总符合率为96.35%。

#### 【注意事项】

1. 实验前请仔细阅读本试剂盒说明书，严格按操作步骤执行。
2. 操作人员在使用本产品前要接受荧光定量PCR实验相关培训。
3. 为了避免交叉污染，不同操作步骤请在指定区域进行。实验室区域设计参考《医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则》。
4. 所有试剂应在规定的条件下储存，在有效期内使用。详细信息见试剂标签。
5. 试剂保存、运输及使用过程中操作不当均可能影响其检测结果，请严格按照说明书规定操作。可能存在样本采集、样本处理及检测过程操作不规范等原因带来的错误结果，应结合临床其他诊疗信息综合判断，必要时复测。
6. 试剂盒剩余试剂及使用过程中产生的废物、废液按照医疗废弃物的处理方式进行处理。

#### 【参考文献】

1. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71(3):209-249.
2. Pancreatic cancer. Lancet, 2020, 395: 2008-20.
3. Advances in pancreatic cancer research: moving towards early detection. World J Gastroenterol, 2014, 20(32):11241-8.
4. 《全国临床检验操作规程》（第四版）
5. 《医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则》

#### 【基本信息】

注册人/生产企业名称：康德（深圳）生物技术有限公司

住所：深圳市南山区粤海街道麻岭社区麻雀岭工业区 M-6 栋中钢大厦 201

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址：深圳市南山区粤海街道麻岭社区麻雀岭工业区 M-6 栋中钢大厦 201

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】