

7 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】

通用名称：7 种微小核糖核酸（microRNA）检测试剂盒（PCR 荧光探针法）

【包装规格】96 人份/盒

【预期用途】

该产品用于体外半定量检测人血浆中 7 种微小核糖核酸（miR-21, miR-26a, miR-27a, miR-122, miR-192, miR-223, miR-801）。主要用于对肝细胞肝癌患者进行动态监测以辅助判断疾病进程或治疗效果，不能作为肝癌或其它肿瘤早期诊断或确诊的依据，不用于普通人群的肿瘤筛查。本试剂盒检测结果不作为判断肝癌疾病进程或治疗效果的唯一依据。本产品不单独用于肝癌的诊断，不可完全替代影像学检查方法，检测结果可供临床参考。

通过比较肝细胞肝癌（简称“肝癌”或 HCC）患者治疗前后 7 种微小核糖核酸（简称 microRNA）表达水平的综合变化，辅助判断疾病进程或治疗效果。microRNA 是在真核生物中发现的一类内源性的具有调控功能的非编码 RNA。研究表明 microRNA 参与多种人体调节，包括发育、病毒防御、造血过程、器官形成、细胞增殖和凋亡、脂肪代谢等。人的血浆中存在大量稳定的 microRNA，并且大量研究揭示 microRNA 与肝癌发病和预后等具有一定的相关性。与肝硬化、肝炎患者及健康人相比，肝癌患者血浆中的 miR-122、miR-21 和 miR-223 水平具有显著的差异^[1]，血清中 miR-192 对胆管细胞性肝癌早期诊断和预后评价具有一定的指导作用^[2,3]，在乳腺癌患者血浆中的 miR-801 水平有上调^[4]，血浆中 miR-223, miR-27a, miR-26a 的表达水平及 AFP 水平可以区分肝癌和健康人群^[5]，血浆中 miR-27a, miR-26a 可以作为肝癌的潜在标记物^[5,6]。有文献报道联合检测血浆中 miR-21, miR-26a, miR-27a, miR-122, miR-192, miR-223, miR-801 可以准确地区分肝癌患者和对照人群，并且在早期肝癌及甲胎蛋白阴性肝癌患者中仍能与对照人群做出准确的区分^[7]。

【检验原理】

本试剂检测过程包括三个步骤：一、microRNA 靶标的捕获；二、microRNA 的反转录；三、与 microRNA 互补的 cDNA 的聚合酶链式扩增和检测。

本试剂盒用交联于磁珠上的与特定 microRNA 靶标互补的寡核苷酸探针来捕获靶标。提取的 microRNA 靶标利用反转录酶和特异的引物合成互补的单链 cDNA。由于引物的发卡结构，与双链结构的 microRNA 前体的退火效率低，所以有较好的特异性。然后通过实时荧光定量 PCR 仪扩增并检测 cDNA。在 PCR 反应中，DNA Taq 聚合酶和特异引物利用 cDNA 作为模板，在每个循环生成一个新的 DNA 拷贝，同时水解带有荧光标记的 Taqman 探针，从而产生荧光，该荧光信号可由光学检测结构捕获。通过分别计算 7 种 microRNA 与内参 miR-1228(基因 8)^[8]的循环数（Ct 值）差值 dCt 来求得每个肝癌相关的标记物的相对定量值。内参是目前普遍采用的基因定量矫正方法。内参可以去除外界因素以及患者自身状态导致的检测干扰，从而将真正的表达差异真实地呈现。miR-1228 在血浆总 microRNA 谱里的表达水平居中，在健康人、慢性乙肝、乙肝肝硬化和肝癌人群中稳定表达，不因疾病状态改变而发生改变。因此，miR-1228（基因 8）可以作为肝癌人群循环 microRNA 定量的稳定内参^[9]。再根据公式 $\text{Logit} = -1.9449 + 0.10633 \times \text{dCt}_{\text{基因1}} + 0.10219 \times \text{dCt}_{\text{基因2}} - 0.012441 \times \text{dCt}_{\text{基因3}} - 0.28902 \times \text{dCt}_{\text{基因4}} - 0.32779 \times \text{dCt}_{\text{基因5}} + 0.25855 \times \text{dCt}_{\text{基因6}}$

- $0.029515 \times \text{dCt}_{\text{基因7}}$ 计算出综合评估值（基因 1-7 分别对应 miR-21, miR-26a, miR-27a, miR-122, miR-192, miR-223 和 miR-801）。

【主要组成成分】

试剂 A

成分	主要成分	规格
核酸提取试剂	含磁珠，靶标捕获探针	1×10mL
洗涤液	含 SDS	2×35mL
洗脱液	含 TWEEN-20	1×2mL

试剂 B

成分	主要成分	规格
反转录反应液	含 dNTPs、反转录酶和引物	1×1mL
扩增检测液 1	含有 dNTPs、DNA Taq 聚合酶、引物和荧光探针	1×1.1mL
扩增检测液 2	含有 dNTPs、DNA Taq 聚合酶、引物和荧光探针	1×1.1mL
扩增检测液 3	含有 dNTPs、DNA Taq 聚合酶、引物和荧光探针	1×1.1mL
扩增检测液 4	含有 dNTPs、DNA Taq 聚合酶、引物和荧光探针	1×1.1mL
扩增检测液 5	含有 dNTPs、DNA Taq 聚合酶、引物和荧光探针	1×1.1mL
扩增检测液 6	含有 dNTPs、DNA Taq 聚合酶、引物和荧光探针	1×1.1mL
扩增检测液 7	含有 dNTPs、DNA Taq 聚合酶、引物和荧光探针	1×1.1mL
扩增检测液 8	含有 dNTPs、DNA Taq 聚合酶、引物和荧光探针	1×1.1mL
稀释缓冲液	含 Tris、EDTA	1×10mL
阳性对照	含 8 种 microRNA	1×10mL
阴性对照	含 8 种 microRNA	1×10mL
空白对照	含有去垢剂的溶液	1×10mL

注: 请勿互换、混合或合并不同批号的试剂盒中的试剂。

本试剂盒中不含样本保存液，推荐使用骏实生物科技（上海）有限公司的样本保存液。

【储存条件及有效期】

试剂 A: 2~8℃保存。

试剂 B: -20℃以下保存（扩增检测液 1-8 需避光保存），避免反复冻融超过 5 次。

有效期: 12 个月，开瓶后请在一个月内使用完毕。

生产日期及失效日期见标签。

【适用仪器】

ABI7500 实时荧光 PCR 仪。

【样本要求】

1、适用样本类型: 血浆(EDTA 抗凝)。不适用于溶血的样本的检测。

2、样本采集: 用无菌注射器抽取受检者外周血 3~4mL 到 EDTA 抗凝管里，立即轻轻颠倒混匀。血浆提取应在外周血采集后的 2 小时内完成。在室温下离心 $1300 \times g$ 20 分钟，抽取上层透明微黄的血浆 0.5mL，加入等量的(0.5mL)样本保存液中，混匀即为待测标本。

3、样本保存和运输: 经上述处理后的标本可立即用于检测，也可存放在 2-8℃（14 天）或冷冻在 -20℃（一个月），需长期（一个月以上）保存的标本存于 -70℃ 冰箱，避免反复冻融超过 5 次。

运输采用 2-8℃冷藏或冷冻密封运输。

【检验方法】

1. 试剂准备

- 在试剂准备区，将试剂盒内的反转录反应液和扩增检测液 1-8 在使用前融化并保持在 2-8℃，核酸提取试剂、洗涤液、洗脱液、稀释缓冲液、阳性对照、阴性对照和空白对照平衡至室温后使用。
- 在试剂准备区，彻底混匀核酸提取试剂，将核酸提取试剂置于涡旋振荡器上剧烈震荡 1 分钟。吸取 100μL 核酸提取试剂到每个 96-孔深孔板（**TP**）的反应孔,参照表 1 位置对应每个孔。每隔 1 分钟彻底混匀核酸提取试剂一次（震荡 15 秒），以保持磁珠处于悬浮状态。
- 在试剂准备区，彻底混匀反转录反应液。吸取 10μL 反转录反应液到 96-孔 PCR 板(**RP**)上，参照表 1 位置对应每个孔, 盖上封板膜, 保存在 2-8℃待用。
- 在试剂准备区，彻底混合扩增检测液 1-8。参照表 2-9，分别吸取 11μL 扩增检测液 1-8 到 96-孔 PCR 板（**PP**）的相应反应孔，盖上封板膜，避光, 保存在 2-8℃待用。

2. microRNA 靶标提取

- 在标本处理区，参照表 1 设定的位置，分别加入 400 μL 阳性对照、阴性对照、空白对照、或血浆标本到 96-孔深孔板（**TP**）的反应孔，盖上封板膜。

注: 样本位置设定详见试剂盒的说明书附页表 1。

不要将液体溅入邻近的孔内或留在孔外。

- 将 96-孔深孔板（**TP**）在混匀仪上快速混匀 1 分钟（850rpm），然后调低到 500rpm 混匀 60 分钟，以保持磁珠处于悬浮状态。
- 在 b 的等待过程中，加入 500μL 洗涤液到 96-孔深孔板（**WP1**）上与表 1 位置对应的每个孔，并将 200μL 洗涤液加入到 96-孔 KingFisher 板（**WP2**）上与表 1 位置对应的每个孔，将 10μL 洗脱液加

入到 96-孔 PCR 板（EP）上与表 1 位置对应的每个孔，待用。

- d. 在 b 完成后，把 Kingfisher96-孔深孔磁头套上磁头套，然后放入含样本的 96-孔深孔板（TP）内，小心、缓慢地上下移动磁头套和磁头 10 次，并放置 2 分钟收集磁珠。然后将磁头套和磁头一起小心转移到加有 500μL 洗涤液的 96-孔深孔板（WP1）。取下磁头，然后用小而快的动作上下移动磁头套约 60 次，洗掉磁头套上的磁珠。

注：不要将液体溅入邻近的孔内。

- e. 将磁头套小心放回到原来含样本的 96-孔深孔板（TP），放上磁头，重复步骤 d，以收集剩下的磁珠。确保所有磁珠都转移到 96-深孔板（WP1）。
- f. 将 96-孔深孔磁头和磁头套放入 96-孔深孔板（WP1）中，小心、缓慢地上下移动磁头套 10 次，并放置 2 分钟收集磁珠，然后将磁头套和磁头小心转移到 96-孔 KingFisher 板（WP2）。取下磁头，然后用小而快的动作上下移动磁头套约 60 次，洗去磁头套上的磁珠。

注：不要将液体溅入邻近的孔内。

- g. 将磁头套小心放回到 96-孔深孔板（WP1）中，重复步骤 f，以收集剩下的磁珠。确保所有磁珠都转移到 96-孔 KingFisher 板（WP2）。
- h. 将 96-孔 PCR 磁头套和磁头放入 96-孔 KingFisher 板（WP2）内，小心、缓慢地上下移动磁头套 10 次后静置 2 分钟收集磁珠。将磁头套和磁头小心转移到含 10μL 洗脱液的 96-孔 PCR 板（EP）。取下磁头，然后用小而快的动作上下移动磁头套约 20 次，以洗去磁头套上的磁珠。

注：不要将液体溅入邻近的孔内。

- i. 将磁头套小心放回到 96-孔深孔板（WP2）中，重复步骤 h，以收集剩下的磁珠，确保所有磁珠都转移到含 10μL 洗脱液的 96-孔 PCR 板（EP），用 PCR 封板膜密封。
- j. 启动热循环仪并设定温度在 70℃。
- k. 将 96-孔 PCR 板（EP）瞬离，在混匀仪上 1800rpm 混匀 1 分钟后，在 70℃热循环仪上放置 5 分钟。
- l. 把 96-孔 PCR 板（EP）迅速放在配套的 96-孔板磁力架上，静置 2 分钟收集磁珠，然后从 96-孔 PCR 板（EP）吸移 5μL 洗脱产物，不要碰到磁珠。按照表 1 上预设的反应孔位置加入到 1(c)预先准备好的含 10μL 反转录反应液的 96-孔 PCR 板（RP）。加样完毕后，用封板膜密封 RP 板。

3. 反转录

- a. 在扩增检测区，使用混匀仪将 RP 板 1200rpm 混匀 15 秒，然后低速离心 15 秒。
- b. 放入热循环仪，按照以下循环参数进行反转录反应。

注：在放入热循环仪前，始终保持反转录反应液和 RP 板在 2-8℃。

步骤	时间	温度
维持	60 分	42℃
维持	5 分	85℃
维持	持续性	4℃

4. PCR 扩增

- a. 在扩增检测区，吸移 75μL 的稀释缓冲液到每个 RP 板反应孔内，稀释反转录产物，使用移液器轻

轻吹打 10 次使彻底混匀，注意避免气泡。

- b. 按照表 2-9 预设的位置，在 1（d）准备的 PCR 板（PP）的相应反应孔里加入 9μL 稀释的反转录产物。
- c. 加样完毕后，用封板膜密封 PCR 板（PP），在混匀仪上以 1200rpm 混匀 15 秒，然后低速离心 15 秒。
- d. 放入 PCR 热循环仪，启动程序。PCR 热循环仪将按照以下循环参数进行扩增和检测。

	酶激活	PCR 扩增	
	维持	循环（40 个循环）	
		变性	退火/延伸
温度	95 °C	95 °C	60 °C
时间	10 分	15 秒	60 秒

- e. 荧光检测通道:FAM（Reporter：FAM，Quencher：NFQ-MGB）；参比荧光（Reference Dye）:ROX。

5. 结果分析

反应结束后自动保存结果。如有必要，根据分析后图像调节基线（Baseline）的起始值（start）和结束值（end）（用户可根据实际情况调整），阈值（Threshold）设为 0.1（ABI7500）。以此计算出的 7 个基因（基因 1-7 分别对应 miR-21, miR-26a, miR-27a, miR-122, miR-192, miR-223 和 miR-801）的 Ct 值分别减去基因 8（miR-1228）的 Ct 值，求得 dCt，然后代入以下公式，计算出综合评估值（Logit）。

$$\text{Logit} = -1.9449 + 0.10633 \times \text{dCt}_{\text{基因1}} + 0.10219 \times \text{dCt}_{\text{基因2}} - 0.012441 \times \text{dCt}_{\text{基因3}} - 0.28902 \times \text{dCt}_{\text{基因4}} - 0.32779 \times \text{dCt}_{\text{基因5}} + 0.25855 \times \text{dCt}_{\text{基因6}} - 0.029515 \times \text{dCt}_{\text{基因7}}。$$

6. 质量控制

空白对照的 8 个基因的 Ct 值都应>34 或无数值，阳性对照和阴性对照的 8 个基因的 Ct 值都应≤34，并有较好的对数增长曲线。阳性对照的综合评估值应≥-0.5，阴性对照的综合评估值应<-0.5。

以上实验结果需在同一批检测试验中同时满足，如果阳性对照、阴性对照、空白对照结果与预期不符，提示检测结果不可靠，不应出具检测报告。

【阳性判断值】

本产品综合评估值的阳性判断值(cut-off 值或阈值)定为-0.5。

为了建立本试剂盒的阳性判断值，采取 304 例临床样本对 7 种 microRNA 和内参进行检测，其中肝癌病例组 112 例，对照组 192 例（包括慢性肝炎患者 44 例、肝硬化患者 14 例，非肝癌恶性肿瘤患者 95 例和健康人 39 例）。

然后利用逻辑回归模型（logistic regression model）建立综合评估值计算模型，计算模型在区分病例组和对照组的 AUC 为 0.806，95%可信区间为 0.757 到 0.849，采用综合评估值-0.5 作为阳性判断值，敏感度为 74.1%，特异度为 73.4%，总符合率 73.7%。

【检验结果的解释】

- a.被检样本的 8 个基因的 Ct 值都应 ≤ 40 ，并有对数增长曲线。否则，检测结果无效，需重复检测。
- b. 当样本综合评估值 ≤ -0.5 时，则该样本为阴性。
- c.当样本综合评估值 ≥ -0.5 时，则该样本为阳性。
- d. 对于正在治疗的肝癌患者，如果样本综合评估值在治疗前检测结果为阳性，可在治疗后进行随访检测，计算其治疗前后综合评估值的下降值。

【检验方法的局限性】

1. 本产品只适用于按照本说明书要求收集和保存的血浆样本的检测。
2. 在肝癌患者的诊治过程中，7 种 microRNA 的检测结果与其他的检查（如：影像学、甲胎蛋白）相结合可提高准确性。microRNA 表达谱的测定不能替代目前已经建立的其它临床检查方法。
3. 对于治疗前综合评估值检测结果为阴性的肝癌患者，不适用于本产品进行辅助判断疾病进程或治疗效果。
4. 7 种 microRNA 的浓度和检测值只针对本试剂有意义，不能作为定量和赋值的绝对证据。
5. 检测溶血的样本可能有错误结果。

【产品性能指标】

1. 分析灵敏度：检测企业最低检测限参考品 A（7 种 microRNA 和内参的浓度都低于 50 拷贝/ μL ）25 次，8 个基因的 Ct 值均 ≤ 34 ，阳性检出率应大于 $\geq 90\%$ 。本试剂盒的分析灵敏度为 50 拷贝/ μL 。
2. 质控特异度：检测 6 份企业阴性参考品(来源于临床上确诊的乙肝、肝硬化、胃癌、肠癌、食道癌或健康人的比对样本)，8 个基因的 Ct 值均 ≤ 40 ，综合评估值结果均阴性。检测 1 份企业特异度参考品（含有基因序列相似的 microRNA 靶标），8 个基因的 Ct 值均 > 34 或无数值。总符合率为 100%。
3. 质控准确度：检测 5 份企业阳性参考品，8 个基因的 Ct 值均 ≤ 40 ，综合评估值结果均阳性，符合率为 100%。
4. 批内精密度：高、低两个浓度的企业精密度参考品各重复测定 10 次，8 个 microRNA 的 Ct 值的 CV 值均 $\leq 5.0\%$ 。
5. 抗干扰性：
当样本含有以下浓度的干扰物质时，对测定结果没有影响。
200 g/L 血红蛋白、1000 uM 胆红素、100 mM 甘油三酯、3 ug/mL 拉米夫定、60 ug/mL 泰诺、40 ng/mL α -干扰素、60 ug/mL 对乙酰氨基酚、12 ug/mL 顺铂。
6. 临床疗效监测的研究：

本产品进行了肝细胞肝癌疗效监测的临床研究，共计入组 236 人，其中符合 PP 集（Per Protocol）疗效监测数据集和治疗后 1-3 月配对的随访对象 192 例，治疗方式包括手术、射频和介入。

肝癌疗效监测的研究对象入选标准：

- 1) 研究对象的肝癌诊断明确且正在或即将接受治疗，有配对随访结果。
- 2) 基线和随访的综合评估值 **logit** 均有效。
- 3) 基线和随访均有影像学（CT 或 MRI）检查报告。

临床疗效的评价指标为肝癌病灶是否达到根治或完全缓解（**Complete Response or Complete Remission, CR**）。

本研究对同一患者，治疗前后的综合评估值的变化情况进行统计分析，评价本产品 in 肝癌疗效监测中的有效性。产品的预期用途为通过比较 HCC 患者治疗前后 7 种微小核糖核酸（**microRNA**）表达水平的综合变化，辅助判断疾病进程或治疗效果。考虑到临床实际使用过程中，当患者治疗前检测的综合评估值结果（治疗前的 **logit** 值，基线）小于-0.5 时，检测结果判定为阴性，该患者不再适用本产品进行疗效监测，故本统计分析仅使用 192 个对象中，基线检测结果大于等于-0.5 的对象进行后续分析，该人群的数量为 160 例。

综上，本统计分析的监测指标和分析数据集分别为：

- 1) 监测指标：下降值=基线的综合评估值 **logit**-随访的综合评估值 **logit**
- 2) 分析数据集：满足肝癌疗效监测入选标准且基线的综合评估值 **logit** 为阳性的研究对象。

160 例基线为阳性的肝癌患者，其中治疗后达到根治或 **CR** 的对象为 71 例，下降值的中位数为 2.56，10%百分位数为 0.89，90%百分位数为 3.71；治疗后没有达到根治或 **CR** 的对象为 89 例，下降值的中位数为 0.15，10%百分位数为-0.61，90%百分位数为 1.27。具体见表 1，两个人群的比较见图 1，两个人群之间的综合评估值 **logit** 的下降值具有显著差异（ $P<0.001$ ）。

表 1 160 例患者的治疗前后综合评估值 **logit** 的下降值

	未达到根治或 CR 的人群	达到根治或 CR 的人群
例数	89	71
均数	0.233	2.408
中位数	0.15	2.56
标准差	0.809	1.014
10%百分位数	-0.61	0.89
90%百分位数	1.27	3.71
最小值	-2.81	-0.72
最大值	2.72	4.23

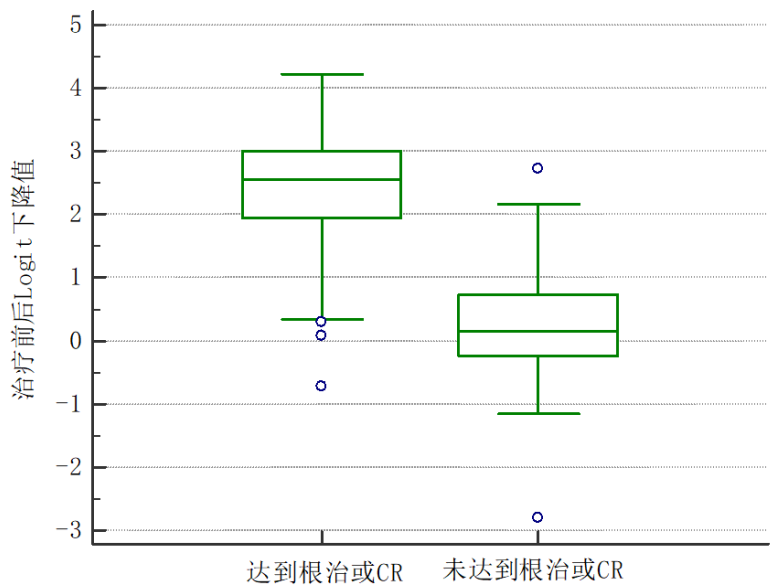


图 1 两个人群综合评估值 logit 的下降值比较

基于表 1，对于基线综合评估值 logit 阳性的人群中，对于达到根治的对象和未根治的对象在治疗后随访时，两个人群的样本密度分布见图 2。

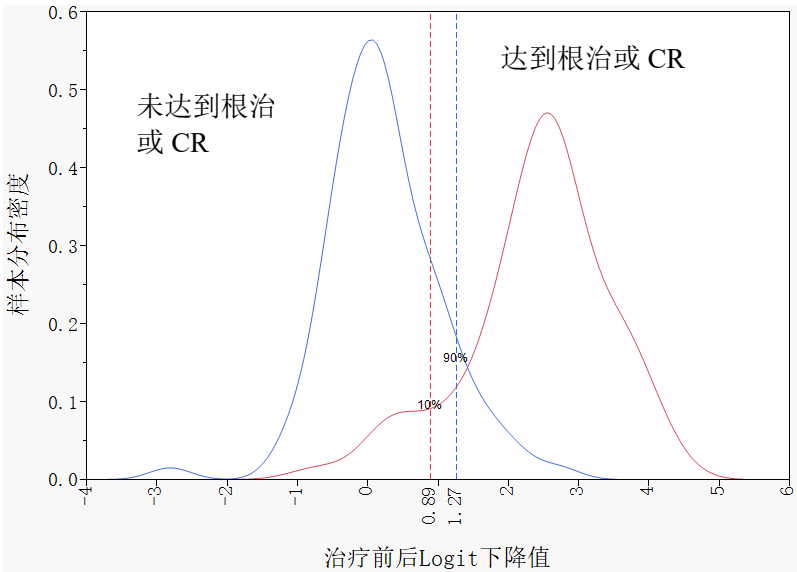


图 2 两个人群综合评估值的下降值密度分布图

基于以上数据，本产品可以有效地通过比较肝细胞肝癌患者治疗前后 7 种微小核糖核酸（microRNA）表达水平的综合变化，辅助判断疾病进程或治疗效果。

【注意事项】

1. 本品仅用于体外诊断。本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者的临床管理应结合其症状、病史、及其它实验室检查、治疗情况，综合考虑。
2. 由于方法学或试剂特异性等原因，使用不同生产商的试剂，对同一份样本进行检测可能会得到不同的检测结果，因此在肿瘤监测过程中，用不同试剂检测所得结果不应直接比较，以免造成错误的医学解释。建议实验室发给临床医生的检测报告应注明所用试剂特征。

3. 由于本产品的检测靶标为 RNA，操作过程中应特别注意防止 RNase 对 RNA 的降解，所有使用的器皿、加样器等均为专用，离心管、吸头等一次性耗材应无 RNase 和 DNase。

4. 检测前应完全理解本包装盒内产品和配套说明书的内容及含义，以确保正确地使用本试剂盒。

5. 标本处理在标本处理区进行。

6. 试剂盒里各组份使用前请充分融化并摇匀，离心管内的试剂需离心数秒后使用。所有试剂应在规定的温度储存，使用时拿到室温下，使用后立即放回。每次实验需设置空白对照，阴性对照与阳性对照。

7. PCR 操作各阶段应在不同实验室进行。应穿工作服，戴一次性手套（经常替换手套），使用一次性用品。PCR 操作人员应具备相应的培训和实际经验。操作过程中用到的操作台、移液器、离心机、扩增仪等仪器设备，应经常用 10%次氯酸、75%乙醇或紫外灯消毒。

8. 扩增检测液 1-8 对光敏感，在储存、准备和使用期间应避免曝光。试剂 B 应避免反复冻融，使用前试剂均应融化。

9. 不同批号的试剂请勿混用，并请在有效期范围内使用。

注：操作过程中移液量、定时等过程必须十分精确，严格按试剂盒说明书操作可以获得最好的结果。警告：使用本试剂盒检测的标本具有传染性物质，请按传染病实验室的规程操作。

【参考文献】

1. Xu J, Wu C, Che X, Wang L, Yu D, Zhang T, Huang L, Li H, Tan W, Wang C, Lin D. Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis. *MolCarcinog.* 2011;50(2):136-42.
2. Silakit R, Loilome W, Yongvanit P, Chusorn P, Techasen A, Boonmars T, Khuntikeo N, Chamadol N, Pairojkul C, Namwat N. Circulating miR-192 in liver fluke-associated cholangiocarcinoma patients: a prospective prognostic indicator. *J HepatobiliaryPancreat Sci.* 2014;21(12):864-72.
3. Motawi TK, Shaker OG, El-Maraghy SA, Senousy MA. Serum MicroRNAs as Potential Biomarkers for Early Diagnosis of Hepatitis C Virus-Related Hepatocellular Carcinoma in Egyptian Patients. *PLoS One.* 2015;10(9):e0137706.
4. Cuk K, Zucknick M, Heil J, Madhavan D, Schott S, Turchinovich A, Arlt D, Rath M, Sohn C, Benner A, Junkermann H, Schneeweiss A, Burwinkel B. Circulating microRNAs in plasma as early detection markers for breast cancer. *Int J Cancer.* 2013;132(7):1602-12.
5. Zuo D, Chen L, Liu X, Wang X, Xi Q, Luo Y, Zhang N, Guo H. Combination of miR-125b and miR-27a enhances sensitivity and specificity of AFP-based diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol.* 2016;37(5):6539-49.
6. Wang C, Hann HW, Ye Z, Hann RS, Wan S, Ye X, Block PD, Li B, Myers RE, Wang X, Juon HS, Civan J, Chang M, Bae HS, Xing J, Yang H. Prospective evidence of a circulating microRNA signature as a non-invasive marker of hepatocellular carcinoma in HBV patients. *Oncotarget.* 2016;9429.

7. Zhou J, Yu L, Gao X, Hu J, Wang J, Dai Z, Wang JF, Zhang Z, Lu S, Huang X, Wang Z, Qiu S, Wang X, Yang G, Sun H, Tang Z, Wu Y, Zhu H, Fan J. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. J ClinOncol. 2011;29(36):4781-8.
8. Hu J, Wang Z, Liao BY, Yu L, Gao X, Lu S, Wang S, Dai Z, Zhang X, Chen Q, Qiu SJ, Wu Y, Zhu H, Fan J, Zhou J, Wang J. Human miR-1228 as a stable endogenous control for the quantification of circulating miRNAs in cancer patients. Int J Cancer. 2014;135(5):1187-94.
9. 《体外诊断试剂说明书编写指导原则》
10. 《临床实验室定量测定室内质量控制指南》
11. 《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》

【基本信息】

注册人/生产企业名称：骏实生物科技（上海）有限公司

住所：上海市闵行区曹建路 161 号

联系电话： 传真：

售后服务单位：

联系电话：

生产地址：上海市闵行区曹建路 161 号一楼 A 区、二楼 A 区

生产许可证编号：

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】

注册证书编号：

产品技术要求编号：

【说明书核准日期及修改日期】

说明书修改日期：

说明书核准日期：

说明书附页:

表 1: 样本提取与反转录, 96 孔板排版

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	空白对照	阴性对照	阳性对照	样本1	样本2	样本3	样本4	样本5	样本6	样本7	样本8	样本9
B	样本10	样本11	样本12	样本13	样本14	样本15	样本16	样本17	样本18	样本19	样本20	样本21
C	样本22	样本23	样本24	样本25	样本26	样本27	样本28	样本29	样本30	样本31	样本32	样本33
D	样本34	样本35	样本36	样本37	样本38	样本39	样本40	样本41	样本42	样本43	样本44	样本45
E	样本46	样本47	样本48	样本49	样本50	样本51	样本52	样本53	样本54	样本55	样本56	样本57
F	样本58	样本59	样本60	样本61	样本62	样本63	样本64	样本65	样本66	样本67	样本68	样本69
G	样本70	样本71	样本72	样本73	样本74	样本75	样本76	样本77	样本78	样本79	样本80	样本81
H	样本82	样本83	样本84	样本85	样本86	样本87	样本88	样本89	样本90	样本91	样本92	样本93

表 2: PCR, 96 孔板排版 1

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
扩增检测液1	A	空白对照	阴性对照	阳性对照	样本1	样本2	样本3	样本4	样本5	样本6	样本7	样本8	样本9
扩增检测液2	B	空白对照	阴性对照	阳性对照	样本1	样本2	样本3	样本4	样本5	样本6	样本7	样本8	样本9
扩增检测液3	C	空白对照	阴性对照	阳性对照	样本1	样本2	样本3	样本4	样本5	样本6	样本7	样本8	样本9
扩增检测液4	D	空白对照	阴性对照	阳性对照	样本1	样本2	样本3	样本4	样本5	样本6	样本7	样本8	样本9
扩增检测液5	E	空白对照	阴性对照	阳性对照	样本1	样本2	样本3	样本4	样本5	样本6	样本7	样本8	样本9
扩增检测液6	F	空白对照	阴性对照	阳性对照	样本1	样本2	样本3	样本4	样本5	样本6	样本7	样本8	样本9
扩增检测液7	G	空白对照	阴性对照	阳性对照	样本1	样本2	样本3	样本4	样本5	样本6	样本7	样本8	样本9
扩增检测液8	H	空白对照	阴性对照	阳性对照	样本1	样本2	样本3	样本4	样本5	样本6	样本7	样本8	样本9

表 3: PCR, 96 孔板排版 2

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
扩增检测液1	A	样本10	样本11	样本12	样本13	样本14	样本15	样本16	样本17	样本18	样本19	样本20	样本21
扩增检测液2	B	样本10	样本11	样本12	样本13	样本14	样本15	样本16	样本17	样本18	样本19	样本20	样本21
扩增检测液3	C	样本10	样本11	样本12	样本13	样本14	样本15	样本16	样本17	样本18	样本19	样本20	样本21
扩增检测液4	D	样本10	样本11	样本12	样本13	样本14	样本15	样本16	样本17	样本18	样本19	样本20	样本21
扩增检测液5	E	样本10	样本11	样本12	样本13	样本14	样本15	样本16	样本17	样本18	样本19	样本20	样本21
扩增检测液6	F	样本10	样本11	样本12	样本13	样本14	样本15	样本16	样本17	样本18	样本19	样本20	样本21
扩增检测液7	G	样本10	样本11	样本12	样本13	样本14	样本15	样本16	样本17	样本18	样本19	样本20	样本21
扩增检测液8	H	样本10	样本11	样本12	样本13	样本14	样本15	样本16	样本17	样本18	样本19	样本20	样本21

表 7: PCR, 96 孔板排版 6

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
扩增检测液1	A	样本58	样本59	样本60	样本61	样本62	样本63	样本64	样本65	样本66	样本67	样本68	样本69
扩增检测液2	B	样本58	样本59	样本60	样本61	样本62	样本63	样本64	样本65	样本66	样本67	样本68	样本69
扩增检测液3	C	样本58	样本59	样本60	样本61	样本62	样本63	样本64	样本65	样本66	样本67	样本68	样本69
扩增检测液4	D	样本58	样本59	样本60	样本61	样本62	样本63	样本64	样本65	样本66	样本67	样本68	样本69
扩增检测液5	E	样本58	样本59	样本60	样本61	样本62	样本63	样本64	样本65	样本66	样本67	样本68	样本69
扩增检测液6	F	样本58	样本59	样本60	样本61	样本62	样本63	样本64	样本65	样本66	样本67	样本68	样本69
扩增检测液7	G	样本58	样本59	样本60	样本61	样本62	样本63	样本64	样本65	样本66	样本67	样本68	样本69
扩增检测液8	H	样本58	样本59	样本60	样本61	样本62	样本63	样本64	样本65	样本66	样本67	样本68	样本69

表 8: PCR, 96 孔板排版 7

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
扩增检测液1	A	样本70	样本71	样本72	样本73	样本74	样本75	样本76	样本77	样本78	样本79	样本80	样本81
扩增检测液2	B	样本70	样本71	样本72	样本73	样本74	样本75	样本76	样本77	样本78	样本79	样本80	样本81
扩增检测液3	C	样本70	样本71	样本72	样本73	样本74	样本75	样本76	样本77	样本78	样本79	样本80	样本81
扩增检测液4	D	样本70	样本71	样本72	样本73	样本74	样本75	样本76	样本77	样本78	样本79	样本80	样本81
扩增检测液5	E	样本70	样本71	样本72	样本73	样本74	样本75	样本76	样本77	样本78	样本79	样本80	样本81
扩增检测液6	F	样本70	样本71	样本72	样本73	样本74	样本75	样本76	样本77	样本78	样本79	样本80	样本81
扩增检测液7	G	样本70	样本71	样本72	样本73	样本74	样本75	样本76	样本77	样本78	样本79	样本80	样本81
扩增检测液8	H	样本70	样本71	样本72	样本73	样本74	样本75	样本76	样本77	样本78	样本79	样本80	样本81

表 9: PCR, 96 孔板排版 8

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
扩增检测液1	A	样本82	样本83	样本84	样本85	样本86	样本87	样本88	样本89	样本90	样本91	样本92	样本93
扩增检测液2	B	样本82	样本83	样本84	样本85	样本86	样本87	样本88	样本89	样本90	样本91	样本92	样本93
扩增检测液3	C	样本82	样本83	样本84	样本85	样本86	样本87	样本88	样本89	样本90	样本91	样本92	样本93
扩增检测液4	D	样本82	样本83	样本84	样本85	样本86	样本87	样本88	样本89	样本90	样本91	样本92	样本93
扩增检测液5	E	样本82	样本83	样本84	样本85	样本86	样本87	样本88	样本89	样本90	样本91	样本92	样本93
扩增检测液6	F	样本82	样本83	样本84	样本85	样本86	样本87	样本88	样本89	样本90	样本91	样本92	样本93
扩增检测液7	G	样本82	样本83	样本84	样本85	样本86	样本87	样本88	样本89	样本90	样本91	样本92	样本93
扩增检测液8	H	样本82	样本83	样本84	样本85	样本86	样本87	样本88	样本89	样本90	样本91	样本92	样本93