

受理号：CSZ2100184

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称： 肿瘤组织起源基因检测试剂盒
(PCR荧光探针法)

产品管理类别： 第三类

申请人名称： 杭州可帮基因科技有限公司

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.....	7
三、 临床评价概述.....	12
四、 产品受益风险判定.....	14
综合评价意见.....	17

基本信息

一、 申请人名称

杭州可帮基因科技有限公司

二、 申请人住所

浙江省杭州市余杭区余杭经济技术开发区新颜路 22 号 7 幢
301M

三、 生产地址

杭州市余杭区龙船坞路 157 号 3 幢 5 层 502 室；杭州市余杭
区龙船坞路 157 号 5 幢 3 层 1309、1310 室

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

试剂盒由以下组分组成，主要组成成分见表 1。

表 1 试剂盒主要组成成分

编号	组分名称	主要成分	数量
1	逆转录预混试剂	引物、脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP)	1管 (250 μ L/管)
2	逆转录酶	RNA依赖性DNA聚合酶	1管 (55 μ L/管)
3	RNA酶抑制剂	抑制剂酶	1管 (15 μ L/管)
4	PCR扩增预混试剂	DNA聚合酶、脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP)	1瓶 (11mL/瓶)
5	探针引物预混板	引物、荧光探针	10板 (4 μ L/孔, 96孔/板)
6	阳性对照品	人源乳腺癌组织总RNA	1管 (10 μ L/管)
7	阴性对照品	人源淋巴细胞系总RNA	1管 (10 μ L/管)
8	稀释液	无核酸酶水	1瓶 (8mL/瓶)
9	透光膜	—	1袋 (10张/袋)
10	加样槽	—	2袋 (5个/袋, 共10个)

具体内容详见产品说明书。

(二) 产品预期用途

本产品适用于定性检测组织分化程度较差或疑似转移的实体肿瘤患者的福尔马林固定、石蜡包埋组织样本中 90 个组织特异基因表达模式 (Gene Expression Pattern)，用于判别肿瘤组织起

源，具体包括：乳腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胃及食管癌、肾癌、肝胆肿瘤、肺癌、黑色素瘤、神经内分泌肿瘤、卵巢癌、前列腺癌、生殖细胞肿瘤、甲状腺癌和尿路上皮癌。

本产品与《肿瘤组织起源基因分析软件》配合使用，不用于区分原发性肿瘤与转移性肿瘤。在恶性肿瘤病理检查过程中，对于不能排除为转移性肿瘤的患者，本产品可为病理医生诊断肿瘤的类型和组织起源提供支持；但在确定肿瘤分期、评估预后和指导治疗等方面，本产品不能替代免疫组化。同时，本产品的检测结果不能作为癌症诊断的唯一依据。病理医生还应参考病史信息、影像学检查和其他病理检查结果，对受检标本的肿瘤类型和组织起源进行综合判断，出具诊断报告。本产品不适用于淋巴瘤和经脱钙处理的骨肿瘤样本。

病理诊断是当前肿瘤诊断的金标准，而免疫组化检测则是病理诊断中对肿瘤进行分型的基础，对于肿瘤分化程度较差（HE切片上缺少肿瘤细胞起源的特征）或者疑似转移性肿瘤尤为重要。肿瘤的分型通常需要联合数个免疫组化抗体，分步骤地进行检测，病理医生往往只能选取数量有限的免疫组化抗体进行检测。免疫组化用于肿瘤诊断所面临的挑战还包括，对于部分肿瘤无法找到特异性的免疫组化抗体。当缺乏特异性的免疫组化标记或少数非特异性免疫组化标记为阳性时，病理诊断往往只能给出较为模糊的诊断结果。国内外文献报道，转移性肿瘤的基因表达谱与转移

部位组织的基因表达谱存在差异，而与其原发部位组织的基因表达谱更相似，提示肿瘤在其发生、发展、转移的过程中，始终保留其组织起源的分子特征。因此，基因表达谱检测可在分子水平揭示肿瘤的组织起源，进而实现对肿瘤的分型。

(三) 产品包装规格

10 测试/盒

(四) 产品检验原理

该产品基于实时荧光 PCR 平台，检测肿瘤样本 RNA 中组织特异基因的表达模式，并与参考数据库中已知肿瘤类型的基因表达模式进行比对，判断待测肿瘤样本组织起源。

该产品利用特异引物对 90 个组织特异基因进行 PCR 扩增，并通过 TaqMan-MGB 探针对扩增产物进行检测，在实时荧光 PCR 平台上获取样本组织特异基因的表达模式。采用《肿瘤组织起源基因分析软件》对待测样本的基因表达模式进行分析，软件可自动比较待测样本与已知组织起源的肿瘤基因表达模式之间的相关性，从而判断待测肿瘤样本的组织起源。《肿瘤组织起源基因分析软件》参考数据库涵盖根据组织细胞起源和解剖学部位定义的 14 种肿瘤类型，具体包括：乳腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胃及食管癌、肾癌、肝胆肿瘤、肺癌、黑色素瘤、神经内分泌肿瘤、卵巢癌、前列腺癌、生殖细胞肿瘤、甲状腺癌及尿路上皮癌。

该产品选用人源管家基因作为内部参照（以下简称内参）系

统，对样本 RNA 提取、逆转录和 PCR 反应过程进行质量控制。

二、临床前研究概述

(一) 主要原材料

1. 主要原材料的选择

该产品的主要原材料包括引物、探针、dNTPs、DNA 聚合酶、随机引物、逆转录酶及对照品等。原材料均通过外购的方式获得。申请人对主要原材料进行了供应商的选择，通过功能性实验筛选出合格供应商，制定了各主要原材料的技术要求和质量标准并经检验合格。

2. 企业参考品和质控品设置情况

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。质控品分为阳性对照品和阴性对照品。

企业参考品的主要原材料为临床组织样本。阳性参考品包括 28 种，分别为该产品涵盖的 14 种肿瘤类型的 FFPE 肿瘤组织样本。阴性参考品包括 8 种，分别为该产品不涵盖的 5 种肿瘤类型的 FFPE 肿瘤组织样本，以及 3 种 FFPE 正常组织样本。检测限参考品包括 15 种，分别为 14 种肿瘤类型最低检测限参考品，由阳性参考品的 RNA 稀释而成；以及 1 种基因表达最低检测限参考品，涵盖该产品所有检测基因。重复性参考品包括 2 种，分别为涵盖该产品所有检测基因的强阳性重复性参考品和弱阳性重复性参考品。基因表达最低检测限参考品和重复性参考品均由临床

肿瘤组织 RNA 样品经逆转录得到 cDNA，采用数字 PCR 方法测定拷贝数后进行稀释而成。

该试剂盒同时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，每个样本均检测内参基因，用于结果的判读及评估样本的质量。

(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引物探针浓度的确定、PCR 扩增预混试剂用量的确定、dNTPs 浓度的确定、随机引物浓度的确定、逆转录酶浓度的确定等；对 PCR 反应条件的研究包括 PCR 反应程序的优化、基线阈值和阈值循环数的确定；对样本采集要求、样本保存时间、样本核酸提取方法和样本用量进行了研究。对产品检测范围内的全部癌种分别进行样本 RNA 的提取及浓度、纯度的研究，确定提取后 RNA 浓度应 $\geq 60\text{ng}/\mu\text{L}$ 且其 A260/A280 应在 1.7~2.1。

通过功能性实验，最终确定了最佳的反应体系。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

该产品分析性能评估内容包括样本稳定性、准确度、分析特异性、最低检测限、精密度、包容性、干扰物质研究。

1. 样本稳定性研究

申请人对该产品适用的福尔马林固定、石蜡包埋（FFPE）病理组织切片保存稳定性、对提取后的 RNA 样本保存条件和冻融稳定性进行了研究。确定该产品可以检测保存时间不超过 3 年的 FFPE 样本；提取后的 RNA 样本在-70℃~-80℃保存不超过 6 个月，冻融次数不超过 3 次。

2. 准确度研究

申请人检测 28 份企业阳性参考品，检测结果分别为对应的肿瘤类型，阳性符合率 100%；检测 8 份企业阴性参考品，检测结果均为阴性，阴性符合率 100%；检测 90 份病理诊断结果明确的低分化或未分化肿瘤和转移性肿瘤临床样本，准确性为 100%。

3. 分析特异性

分析特异性研究包括组织起源鉴别能力研究和交叉反应研究。申请人选择产品检测范围内的全部癌种的转移性肿瘤样本，使用三个批次的试剂盒对该产品的组织起源鉴别能力进行研究，检测结果显示能准确鉴别肿瘤组织及其配对癌旁组织样本的不同组织起源。申请人选择产品检测范围外的 8 种肿瘤组织或正常组织样本进行交叉反应研究，包括淋巴瘤、阴茎癌、骨髓瘤、胸腺癌、皮肤鳞癌、淋巴结组织、扁桃体组织、皮肤组织，结果均为阴性。

4. 最低检测限研究

最低检测限研究包括各个靶基因最低检测限的研究和可检测肿瘤组织最低比例的研究。

申请人使用三个不同批次的试剂盒分别对产品 90 个靶基因的最低检测限进行研究，确定试剂盒对于每个靶基因最低检测限，结果显示各个靶基因的最低检测限为 5 拷贝/ μL 至 50 拷贝/ μL 。

申请人使用三个不同批次的试剂盒分别对产品检测范围内的全部癌种进行研究。对每种肿瘤类型的不同肿瘤细胞比例的样本进行检测，确定可检测肿瘤组织的最低比例为肿瘤细胞比例 60%。

5. 精密度

精密度研究采用三个不同批次的试剂盒，通过不同地点、人员、轮次、日间和批次对不同癌种的肿瘤临床样本进行连续 20 天精密度研究，检测结果（相似度分数最大值）变异系数 CV 均不高于 15%。

对连续三批生产的试剂盒采用企业强阳性重复性参考品和弱阳性重复性参考品进行重复性检测，每批试剂盒每份参考品重复检测 10 次，每个靶基因的 Ct 值变异系数 CV 均不高于 5%。

6. 包容性研究

申请人采用三个不同批次的试剂盒对试剂盒检测范围内的各肿瘤类型及相关亚型进行包容性确认，结果表明试剂盒对各肿瘤类型及其相关亚型均能正确检出，试剂盒包容性良好。

7. 干扰物质研究

干扰物质研究分为外源性干扰物质研究和内源性干扰物质研究。

外源性干扰物研究包括针对 FFPE 样本在处理过程中的常见的酒精、福尔马林和石蜡的干扰试验研究。研究结果表明，当酒精 $\leq 1\%$ (V/V)、福尔马林 $\leq 0.005\%$ (V/V)、石蜡 $\leq 1\%$ (V/V)时，对该产品的检测结果不产生干扰。

内源性干扰物研究包括针对癌旁组织和坏死组织的干扰试验研究。研究结果表明，当待测样本中癌旁组织或坏死组织比例 $\leq 40\%$ 时，对该产品的检测结果不产生影响。

(四) 阳性判断值研究

该产品阳性判断值的研究采用诊断信息明确的 600 例临床肿瘤样本，涵盖全部肿瘤类型。对 600 例肿瘤临床样本的最大相似度分数采用最优离散化算法确定试剂盒的相似度分数阳性判断值为 45.3。结果显示当相似度分数 < 45.3 时，样本的检测结果为阴性；当相似度分数 ≥ 45.3 时，样本的检测结果为阳性。

当以最大相似度分数 45.3 作为阳性判断值，对诊断明确的临床肿瘤样本的组织起源或类型进行判定时，各肿瘤类型的阳性符合率和阴性符合率，结果如下：

肿瘤类型	阳性符合率	阴性符合率
乳腺癌	100.00%	100.00%
宫颈癌	93.33%	99.39%
结直肠癌	93.33%	99.60%
胃及食管癌	89.47%	98.77%

肾癌	96.00%	100.00%
肝胆肿瘤	96.00%	99.20%
肺癌	95.12%	99.59%
黑色素瘤	100.00%	100.00%
神经内分泌肿瘤	94.12%	100.00%
卵巢癌	93.75%	99.59%
前列腺癌	100.00%	100.00%
生殖细胞肿瘤	91.67%	100.00%
甲状腺癌	100.00%	100.00%
尿路上皮癌	96.15%	99.80%

（五）稳定性研究

申请人对该产品的稳定性研究包括货架效期稳定性、运输稳定性和使用稳定性（包括开瓶稳定性、冻融稳定性）。

货架有效期稳定性：将三批次试剂盒置于-15℃~-25℃保存，分别于不同时间点使用企业参考品对试剂盒的性能进行检测，结果表明试剂盒在-15℃~-25℃保存条件下，产品有效期为 12 个月。

此外，申请人对产品的运输稳定性和使用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的声称。

三、 临床评价概述

申请人以临床试验的方式进行临床评价。临床试验在复旦大学肿瘤医院、北京肿瘤医院和浙江省肿瘤医院共三家临床试验机

构开展，采用试验医疗器械对肿瘤组织起源的判定结果与临床参考标准（即组织病理学检查结果）进行比较研究，评价试验医疗器械临床性能。入组样本主要为低分化肿瘤、未分化肿瘤和转移性肿瘤 FFPE 样本，肿瘤类型包括乳腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胃及食管癌、肾癌、肝胆肿瘤、肺癌、黑色素瘤、神经内分泌肿瘤、卵巢癌、前列腺癌、生殖细胞肿瘤、甲状腺癌和尿路上皮癌等共 14 种肿瘤。

临床试验共计入组 1010 例受试者，阳性样本共计 923 例，阴性样本 87 例（阴茎癌、淋巴瘤、皮肤鳞癌等在本研究中作为阴性病例）；其中低分化肿瘤、未分化肿瘤共计 656 例，转移性肿瘤共 192 例；各种肿瘤阳性病例数分别为：乳腺癌 88 例、宫颈癌 63 例、结直肠癌 53 例、胃及食管癌 66 例、肾癌 27 例、肝胆肿瘤 62 例、肺癌 105 例、黑色素瘤 54 例、神经内分泌肿瘤 41 例、卵巢癌 53 例、前列腺癌 31 例、生殖细胞肿瘤 40 例、甲状腺癌 67 例和尿路上皮癌 51 例。

试验结果显示，试验体外诊断试剂检测结果与组织病理学检查结果的阳性符合率为 90.79%（95%CI: 88.74%，92.58%），阴性符合率为 91.95%（95%CI: 84.12%，96.70%），总符合率 90.89%（95%CI: 88.95%，92.59%）；每种肿瘤阳性符合率均高于 85%。针对 172 例转移性肿瘤，试验体外诊断试剂检测结果与临床诊断结果符合率为 81.98%。

综上所述，该产品与组织病理学检查具有良好的一致性，产品临床性能满足临床需求。

四、产品受益风险判定

根据《YY/T 0316-2016 医疗器械风险管理对医疗器械的应用》及其内部质量管理体系规定执行风险管理相关活动，对该产品进行受益风险判定。

(一) 受益评估

本产品适用于定性检测组织分化程度较差或疑似转移的实体肿瘤患者的福尔马林固定、石蜡包埋组织样本中 90 个组织特异基因表达模式（Gene Expression Pattern），用于判别肿瘤组织起源，具体包括：乳腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胃及食管癌、肾癌、肝胆肿瘤、肺癌、黑色素瘤、神经内分泌肿瘤、卵巢癌、前列腺癌、生殖细胞肿瘤、甲状腺癌和尿路上皮癌。该产品可以为病理医生提供一种肿瘤组织起源或肿瘤分类辅助诊断方法的选择。在恶性肿瘤病理检查过程中，对于不能排除为转移性肿瘤的患者，本产品可为病理医生诊断癌症的类型和组织起源提供支持，需进一步加做免疫组化标记明确肿瘤的原发病灶。

(二) 风险评估

该产品已知和可预见的风险主要有以下几个方面：

该产品的检测结果不能作为癌症诊断的唯一依据。在具体临床应用时，病理医生还应参考病史信息、影像学检查和其他病理

检查结果，对受检标本的肿瘤类型和组织起源进行综合判断，出具诊断报告。

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。

恶性肿瘤在转移过程中易发生分子特征的改变，导致肿瘤特征基因的表达特异性降低，使得该试剂盒在转移性肿瘤中的性能降低，可能造成判断错误。

不合理的样本采集、转运及处理，以及不当的试验操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。

该产品仅限于规定的样本类型及检测仪器和系统（包括适用机型、核酸提取试剂、检测方法、肿瘤组织起源基因分析软件等）。

该产品适用于包含在参考数据库中的 14 种肿瘤类型。当检测结果为阴性或无法判别时，提示该样本可能属于 14 种以外的其他肿瘤类型；或该样本中 RNA 浓度较低，不在该试剂盒检测能力范围内。

通过风险/受益综合评价，合理地定义了该产品受益和风险的种类和可能性。目前已知及可预见风险均提出了相应的控制措施和适应症限制，能较大程度的满足医疗需求。经综合评价，认为该产品上市带来的预期受益大于风险，综合剩余风险可接受。

尽管目前认为该试剂盒的受益大于风险，但为保证用械安全，

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：

本产品与《肿瘤组织起源基因分析软件》配合使用，不用于区分原发性肿瘤与转移性肿瘤。在恶性肿瘤病理检查过程中，对于不能排除为转移性肿瘤的患者，本产品可为病理医生诊断肿瘤的类型和组织起源提供支持；但在确定肿瘤分期、评估预后和指导治疗等方面，本产品不能替代免疫组化。同时，本产品的检测结果不能作为癌症诊断的唯一依据。病理医生还应参考病史信息、影像学检查和其他病理检查结果，对受检标本的肿瘤类型和组织起源进行综合判断，出具诊断报告。本产品不适用于淋巴瘤和经脱钙处理的骨肿瘤样本。

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

本申报项目为境内第三类医疗器械产品注册，属于境内同品种首个产品。申请人的注册申报资料符合现行要求，依据《医疗器械监督管理条例》（国务院令第 680 号）、《体外诊断试剂注册管理办法》（原国家食品药品监督管理总局令 2014 年第 5 号）等相关医疗器械法规与配套规章，经系统评价后，建议准予注册。

2022 年 7 月 10 日

附件：产品说明书

肿瘤组织起源基因检测试剂盒（PCR荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：肿瘤组织起源基因检测试剂盒（PCR荧光探针法）

【包装规格】

10测试/盒

【预期用途】

本产品适用于定性检测组织分化程度较差或疑似转移的实体肿瘤患者的福尔马林固定、石蜡包埋组织样本中90个组织特异基因表达模式

（Gene Expression Pattern），用于判别肿瘤组织起源，具体包括：乳腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胃及食管癌、肾癌、肝胆肿瘤、肺癌、黑色素瘤、神经内分泌肿瘤、卵巢癌、前列腺癌、生殖细胞肿瘤、甲状腺癌和尿路上皮癌。

本产品与《肿瘤组织起源基因分析软件》配合使用，不用于区分原发性肿瘤与转移性肿瘤。在恶性肿瘤病理检查过程中，对于不能排除为转移性肿瘤的患者，本产品可为病理医生诊断肿瘤的类型和组织起源提供支持；但在确定肿瘤分期、评估预后和指导治疗等方面，本产品不能替代免疫组化。同时，本产品的检测结果不能作为癌症诊断的唯一依据。病理医生还应参考病史信息、影像学检查和其他病理检查结果，对受检标本的肿瘤类型和组织起源进行综合判断，出具诊断报告。本产品不适用于淋巴瘤和经脱钙处理的骨肿瘤样本。

病理诊断是当前肿瘤诊断的金标准，而免疫组织化学（简称“免疫组

化”)检测则是病理诊断中对肿瘤进行分型的基础,对于肿瘤分化程度较差(HE切片上缺少肿瘤细胞起源的特征)或者疑似转移性肿瘤尤为重要。肿瘤的分型通常需要联合数个免疫组化抗体,分步骤地进行检测,病理医生往往只能选取数量有限的免疫组化抗体进行检测。免疫组化用于肿瘤诊断所面临的挑战还包括,对于部分肿瘤无法找到特异性的免疫组化抗体。当缺乏特异性的免疫组化标记或少数非特异性免疫组化标记为阳性时,病理诊断往往只能给出较为模糊的诊断结果^[1]。国内外文献报道,转移性肿瘤基因表达谱与转移部位组织的基因表达谱存在差异,而与其原发部位组织的基因表达谱更相似,提示肿瘤在其发生、发展、转移的过程中,始终保留其组织起源的分子特征^[2-3]。因此,基因表达谱检测可在分子水平揭示肿瘤的组织起源,进而实现对肿瘤的分型。

【检验原理】

本产品基于实时荧光PCR平台,检测肿瘤样本RNA中组织特异基因的表达模式,并与参考数据库中已知肿瘤类型的基因表达模式进行比对,判断待测肿瘤样本组织起源。

本产品利用特异引物对90种组织特异基因进行PCR扩增,并通过TaqMan-MGB探针对扩增产物进行检测,在实时荧光PCR平台上获取样本组织特异基因的表达模式。采用《肿瘤组织起源基因分析软件》对待测样本的基因表达模式进行分析,软件可自动比较待测样本与已知组织起源的肿瘤基因表达模式之间的相关性,从而判断待测肿瘤样本的组织起源。

《肿瘤组织起源基因分析软件》参考数据库涵盖以下适用的14种肿瘤类型

的基因表达模式：乳腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胃及食管癌、肾癌、肝胆肿瘤、肺癌、黑色素瘤、神经内分泌肿瘤、卵巢癌、前列腺癌、生殖细胞肿瘤、甲状腺癌及尿路上皮癌。

本产品选用人源管家基因作为内部参照（以下简称内参，Internal Control（IC））系统，对样本RNA提取、逆转录和PCR反应过程进行质量控制。

【主要组成成分】

1. 本试剂盒主要组成及组分如下：

表1 试剂盒组成及组分表

编号	组分名称	主要成分	数量
1	逆转录预混试剂	引物、脱氧核糖核苷三磷酸（dNTP）	1管（250 μ L/管）
2	逆转录酶	RNA依赖性DNA聚合酶	1管（55 μ L/管）
3	RNA酶抑制剂	抑制剂酶	1管（15 μ L/管）
4	PCR扩增预混试剂	DNA聚合酶、脱氧核糖核苷三磷酸（dNTP）	1瓶（11mL/瓶）
5	探针引物预混板	引物、荧光探针	10板（4 μ L/孔，96孔/板）
6	阳性对照品	人源乳腺癌组织总RNA	1管（10 μ L/管）
7	阴性对照品	人源淋巴细胞系总RNA	1管（10 μ L/管）
8	稀释液	无核酸酶水	1瓶（8mL/瓶）
9	透光膜	—	1袋（10张/袋）
10	加样槽	—	2袋（5个/袋，共10个）

注意：

1) 随意替换试剂盒中的任何试剂，都可能影响使用效果。不同批号试剂盒中各组分不可相互混用。

2) 其中, 探针引物预混板 (96 孔 PCR 反应板) 布局, 如下表:

表 2 探针引物预混板布局

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

其中A2为待测样本内参基因 (IC) 检测孔, H11为无模板对照 (NTC) 检测孔, A1、A12、H1和H12孔未预置探针引物, 剩余90孔为待测样本组织特异性基因检测孔。

2. 试剂盒不包含但检测必须的试剂组分:

RNA 提取试剂盒: 杭州可帮基因科技有限公司的石蜡包埋组织总 RNA 提取试剂盒 (吸附柱法) (浙杭械备 20170206 号)。

3. 完成本检测所需的其他仪器和耗材:

- 1) 无核酸酶的移液器吸嘴;
- 2) 无核酸酶的1.5mL离心管及0.2mL PCR管;
- 3) 微量紫外分光光度计;
- 4) 掌上离心机;
- 5) 96孔板离心机;

- 6) 恒温金属浴/PCR仪（可选，用于逆转录反应）；
- 7) 单通道移液器、多通道移液器；
- 8) 96孔板透光膜敷贴器；
- 9) 联网且已安装《肿瘤组织起源基因分析软件》的电脑。

4. 试剂盒质控品主要组成成分及生物学来源：

- 1) 阳性对照品是外购商品化人源总 RNA；来源于乳腺癌组织，浓度为 $100\text{ng}/\mu\text{L}\pm 10\text{ng}/\mu\text{L}$ ；相似度分数 ≥ 45.3 ，判读结果为乳腺癌。
- 2) 阴性对照品是外购商品化人源总 RNA；来源于淋巴细胞系，浓度为 $100\text{ng}/\mu\text{L}\pm 10\text{ng}/\mu\text{L}$ ；相似度分数 < 45.3 ，判读结果为阴性。

【储存条件及有效期】

1. 试剂盒有效期：在 $-15^{\circ}\text{C}\sim -25^{\circ}\text{C}$ 保存，有效期为 12 个月。
试剂盒生产日期、失效日期：见标签。
2. 运输条件：不高于 8°C 条件下运输。收到货后试剂盒需 $-15^{\circ}\text{C}\sim -25^{\circ}\text{C}$ 保存。试剂盒开封后有效期为 12 个月，其中透光膜及加样槽建议开封后室温保存，PCR 扩增预混试剂和稀释液开封后 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存，其余试剂 $-15^{\circ}\text{C}\sim -25^{\circ}\text{C}$ 保存；避免反复冻融，冻融次数不超过 5 次。

【适用仪器】

1. 本试剂盒适用于 ABI7500 荧光 PCR 仪。
2. 使用 ABI7500 荧光 PCR 仪时探针模式设置，报告基团：FAM，参比荧光染料：ROX。

【样本要求】

1. 适用样本类型：福尔马林固定、石蜡包埋（FFPE）病理组织切片，切片厚度推荐为 $5\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ 。切片表面积推荐为 $0.5\text{cm}^2\sim 1.0\text{cm}^2$ ，切片用量推荐为 5 张~15 张，如果组织小于 0.5cm^2 ，请适当增加切片用量。
2. 手术前接受任何治疗（如放化疗、靶向治疗、新辅助化疗等）的肿瘤患者的 FFPE 样本；穿刺样本（包括粗针穿刺和细针穿刺样本）；冰冻样本、塑胶包被的样本、细胞块或者细胞学样本，均不适用于本产品。
3. 福尔马林固定和石蜡包埋的程序会导致核酸的片段化和核酸分子间的交联。为了保证提取得到的 RNA 质量，在 FFPE 样本制备过程中，请根据《临床技术操作规范-病理学分册》进行常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋^[4]。
4. RNA 提取液需用微量紫外分光光度计测定浓度和纯度，RNA 浓度应 $\geq 60\text{ng}/\mu\text{L}$ 且其 A_{260}/A_{280} 应在 $1.7\sim 2.1$ 。提取的 RNA 建议立即进行检测，否则请于 $-70^{\circ}\text{C}\sim -80^{\circ}\text{C}$ 保存，保存时间不超过 6 个月，冻融次数不超过 3 次。
5. 石蜡包埋组织一般选择保存未超过 3 年的样本，尽量避免坏死组织及石蜡边缘，所取部分尽量在蜡块中部。
6. 样本或经富集处理后样本的肿瘤细胞比例 $\geq 60\%$ ，坏死组织比例 $< 40\%$ 。

【检验方法】

1. 样本 RNA 的提取及浓度、纯度测定

1.1 RNA 提取：具体请参照石蜡包埋组织总 RNA 提取试剂盒（吸附柱法）

的说明书进行。

1.2 RNA 浓度和纯度测定：对步骤 1.1 中提取的 RNA 进行浓度和纯度测定，如下：

1) 打开微量紫外分光光度计，选择“核酸模式”，选择检测的样本类型“RNA”；

2) 取石蜡包埋组织总RNA提取试剂盒（吸附柱法）中的RNA洗脱液 1 μ L，选择“背景扣除/空白对照”；

3) 取1 μ L RNA溶液，测定其浓度和A260/A280比值。

注意：RNA浓度 $\geq 60\text{ng}/\mu\text{L}$ 且A260/A280比值在1.7~2.1范围内，即可进行下一步反应。如果提取的RNA未同时满足上述条件，请重新抽提。

2. 逆转录反应

2.1 解冻逆转录预混试剂，振荡混匀， $\geq 5000\text{rpm}$ 瞬时离心10秒。依据所需检测样本数量按下表比例计算，并在无核酸酶的1.5mL离心管中配制逆转录反应液。建议每次逆转录反应，均设置无模板对照，准备n+1（n为待测样本，1为无模板对照）管逆转录反应液。

表3 逆转录反应液配制比例表（/管）

组成成份	体积（ μL ）/管
逆转录预混试剂	12
逆转录酶	2.5
RNA酶抑制剂	0.7
总计	15.2

2.2 将上述混合液用移液器吹打混匀， $\geq 5000\text{rpm}$ 瞬时离心10秒；

2.3 取适量0.2mL PCR管/1.5mL离心管，每管分装15.2μL逆转录反应液；

2.4 取其中一管逆转录反应管，加入35μL稀释液，吹打混匀，作为无模板对照；

2.5 向其余反应管中分别加入35μL待测样本RNA或已稀释的阳性对照品或阴性对照品，吹打混匀；

注意：阳性对照品和阴性对照品进行逆转录反应前，需在冰上进行解冻， $\geq 5000\text{rpm}$ 瞬时离心10秒后，在对应试剂管中悬空加入25μL的稀释液，制备成已稀释的阳性对照品或阴性对照品。其他操作同待测样本。

2.6 将所有反应管 $\geq 5000\text{rpm}$ 瞬时离心10秒；

2.7 将反应管放入恒温金属浴/PCR仪中进行逆转录反应，反应条件如下：

表4 逆转录反应程序

	步骤1	步骤2	步骤3	步骤4
温度	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
时间	10 分钟	120 分钟	5 分钟	∞

2.8 逆转录反应完成后，反应产物cDNA溶液可用于后续PCR扩增。若不能立即进行扩增，可将cDNA溶液在2°C~8°C保存，保存时间不宜超过24小时。

3. PCR 扩增

3.1 根据所检测样本数取出n（n为待测样本）个加样槽，在每一个加样槽中分别加入1080μL的PCR扩增预混试剂和598μL的稀释液；

3.2 将步骤2.8中待测样本的全部逆转录产物分别转移至步骤3.1加样槽中，进行稀释，移液器吸打混匀；

注意：反应组分已经包含了富余量。

3.3 根据所检测样本数取出n（n为待测样本）块探针引物预混板，将探针引物预混板解冻，振荡混匀，2500rpm转速离心1分钟，使得每个反应孔内的探针引物离心至管底；每块探针引物预混板只能用于一份cDNA样本进行PCR扩增；

3.4 轻轻揭开探针引物预混板的封板膜；

3.5 在NTC孔（H11孔）中分别加入10 μ L PCR扩增预混试剂、6 μ L NTC逆转录产物，作为PCR扩增的无模板对照；

3.6 使用多通道移液器吸取步骤3.2中的混合液16 μ L，分别加入探针引物预混板的其余每个反应孔内；

注意：使用多通道移液器加样时，H11孔勿加入混合液。

3.7 用透光膜密封探针引物预混板，振荡混匀，2500rpm转速离心1分钟。

注意：阳性对照品和阴性对照品的PCR扩增操作同待测样本。

4. PCR 反应板加载

4.1 将探针引物预混板放入实时荧光 PCR 仪器；

4.2 打开仪器窗口，选择相对定量反应，进行样品板设置，其中“探针名”设置为Origin-PanCA，“样品名”为对应样本编号，对PCR反应板的96孔均指定上述探针名和样品名；选择20 μ L反应体系，创建循环参数：

第一阶段：95 $^{\circ}$ C 10分钟 1个循环；

第二阶段：95 $^{\circ}$ C 15秒 60 $^{\circ}$ C 1分钟 40个循环。

信号收集：第二阶段60 $^{\circ}$ C时收集FAM信号，执行荧光PCR；保存文件。

4.3 在完成PCR反应后，自动导出PCR数据。

5. 质量控制

5.1 检测无模板对照（NTC）的荧光信号（H11孔），用于判断是否存在体系污染：

- 1) 若Ct值 ≥ 38 ，或者Ct值无显示，无扩增曲线，则继续分析；
- 2) 若Ct值 < 38 ，则说明体系可能存在污染，试验结果不可信，需重新提取。

5.2 检测内参基因（IC）的荧光信号（A2孔），用于评估被检测RNA的质量：

- 1) 若Ct值 < 38 ，则继续分析；
- 2) 若Ct值 ≥ 38 ，说明RNA可能存在部分片段化或降解，试验结果不可信，建议重新提取RNA后再进行实验。

6. 数据上传

6.1 打开《肿瘤组织起源基因分析软件》客户端，登录后，输入样本临床信息并上传PCR数据；

注意：实验前请及时使用《肿瘤组织起源基因分析软件》安装程序进行客户端的安装，并根据软件使用说明进行用户注册。

6.2 软件自动对原始数据进行预处理，获得该样本特异的基因表达模式；并与参考数据库中储存的各肿瘤类型基因表达模式进行对比，《肿瘤组织起源基因分析软件》自动计算相似度分数；获得分析结果（见图1 肿瘤组织起源基因检测结果图）。

【阳性判断值】

1. 内参基因（IC孔）Ct值 <38 。
2. 无模板对照（NTC孔）Ct值 ≥ 38 ，或者Ct值无显示，无扩增曲线。
3. 结果判定：肿瘤组织起源基因分析的相似度分数阳性判断值为45.3。

本试剂盒检测结果通过配套使用的软件进行分析。该分析软件核心算法基于肿瘤基因表达数据进行监督学习，筛选特征基因，构建分类模型，计算肿瘤样本基因表达模式与算法分类模型中储存的已知肿瘤类型的基因表达模式的相似度，实现对临床样本肿瘤类型的判别。

【检验结果的解释】

1. 本产品可同时检测样本中90个组织特异基因的表达模式和1个内参基因表达情况。
2. 采用《肿瘤组织起源基因分析软件》将样本90个组织特异基因的表达模式与参考数据库进行对比，计算相似度分数，根据相似度最高原则判定该样本的肿瘤类型。

若相似度分数最大值大于等于45.3，判别结果为阳性，提示样本最有可能起源于最高相似度分数对应的组织类型。

若相似度分数最大值低于45.3，提示检测基因表达模式非特异，可能由于样本中肿瘤组织成分过低，也可能该样本所属肿瘤类型没有包括在参考数据库中，因此判别结果为阴性。

如图1所示，该肿瘤样本最有可能的3种组织来源分别为：乳腺、宫颈和肺，相似度分数分别为97.3、1和0.4。根据相似度分数最高的判定规则，

该肿瘤样本最有可能来源于乳腺组织，因此判定为乳腺癌。

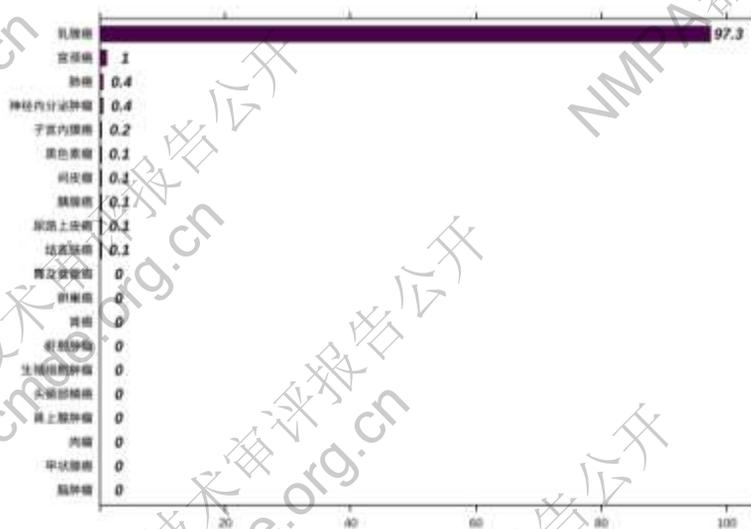


图1 肿瘤组织起源基因检测结果图

注意：本产品不适用于肾上腺肿瘤、脑肿瘤、间皮瘤、胰腺癌、头颈部鳞癌、子宫内膜癌、肉瘤的组织起源判定，当检测结果中最高相似性分数对应为上述肿瘤类型时，该样本的组织起源判定结果为无法判别。

3. 以最大相似性分数45.3作为阳性判断值，对诊断明确的临床肿瘤样本的组织起源或类型进行判定，分别计算14种肿瘤类型的阳性符合率和阴性符合率，结果如下：

肿瘤类型	阳性符合率	阴性符合率
乳腺癌	100.00%	100.00%
宫颈癌	93.33%	99.39%
结直肠癌	93.33%	99.60%
胃及食管癌	89.47%	98.77%
肾癌	96.00%	100.00%
肝胆肿瘤	96.00%	99.20%
肺癌	95.12%	99.59%

黑色素瘤	100.00%	100.00%
神经内分泌肿瘤	94.12%	100.00%
卵巢癌	93.75%	99.59%
前列腺癌	100.00%	100.00%
生殖细胞肿瘤	91.67%	100.00%
甲状腺癌	100.00%	100.00%
尿路上皮癌	96.15%	99.80%

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者的诊断应结合其症状/体征、病史、影像学检查及其他实验室检查等情况综合考虑。
2. 本试剂盒仅适用于包含在参考数据库中的 14 种肿瘤类型。当检测结果为阴性或无法判别时，提示该样本可能属于 14 种以外的其他肿瘤类型；或该样本中 RNA 浓度较低，不在本试剂盒检测能力范围内。
3. 恶性肿瘤在转移过程中易发生分子特征的改变，导致肿瘤特征基因的表达特异性降低，使得本试剂盒在转移性肿瘤中的性能降低，可能造成判断错误。病理医生应参考患者的病史信息、影像学检查和其他病理检查结果，对受检标本的肿瘤类型和组织起源进行综合判断。
4. 本试剂盒不适用于区分良性与恶性病变，不适用于区分原发性肿瘤与转移性肿瘤，不适用于区分肿瘤组织病理亚型，也不适用于评估肿瘤患者的治疗效果和生存状况。
5. 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。

6. 不合理的样本采集、转运及处理，以及不当的试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仪器和系统（包括适用机型、核酸提取试剂、检测方法、肿瘤组织起源基因分析软件等）。

【产品性能指标】

1. 试剂盒应组分齐全，包装外观清洁、无漏液、无破损；标志标签字迹清楚。试剂融化后，应澄清，无浑浊。

2. 准确度

1) 阳性符合率：检测28份企业阳性参考品，检测结果应分别为对应的肿瘤类型，阳性符合率100%。

2) 阴性符合率：检测8份企业阴性参考品，检测结果均为阴性，阴性符合率100%。

3) 临床样本准确度：检测90份病理诊断明确的低分化或未分化肿瘤和转移性肿瘤临床样本，准确性为100%。

3. 分析特异性：选取14种肿瘤临床样本，同步检测每例样本的肿瘤组织及其癌旁组织，检测结果均能准确鉴别肿瘤组织与癌旁组织不同起源。

4. 最低检测限：检测14份企业肿瘤类型最低检测限参考品，检测结果应分别为对应的肿瘤类型；检测1份企业基因表达最低检测限参考品，重复检测3次，每个基因的Ct值应均 <38 ；检测肿瘤细胞比例60%的14种肿瘤样本，检测结果分别为对应的肿瘤类型，且基因表达Ct值与数字PCR验证结果符合。

5. 精密度

1) 重复性：分别检测1份企业弱阳性重复性参考品和1份企业强阳性重复性参考品，每份参考品重复检测10次，每个基因的Ct值变异系数CV应不高于5%。

2) 采用肿瘤临床样本分别对试验日内/间、操作者间、实验室间精密度进行评价，检测结果（相似度分数最大值）变异系数CV均不高于15%。

6. 包容性研究：选择本试剂盒检测范围内的14种肿瘤类型及相关亚型，具体包括：乳腺癌（乳腺导管癌、乳腺小叶癌）、宫颈癌（宫颈鳞癌、宫颈腺癌）、结直肠癌（结肠癌、直肠癌）、胃及食管癌（胃癌、食管癌）、肾癌（嫌色细胞癌、透明细胞癌、乳头状肾癌）、肝胆肿瘤（肝细胞肝癌、胆管细胞癌）、肺癌（肺腺癌、细支气管肺泡癌、肺大细胞癌、肺鳞癌）、黑色素瘤（皮肤黑色素瘤、眼黑色素瘤）、神经内分泌肿瘤（肺小细胞癌、胰腺神经内分泌肿瘤）、卵巢癌（卵巢内膜样腺癌、卵巢浆液性腺癌、透明细胞癌、粘液性癌）、前列腺癌（前列腺腺癌）、生殖细胞肿瘤（生殖细胞瘤、精原细胞瘤、胚胎瘤、畸胎瘤、卵黄囊瘤）、甲状腺癌（甲状腺乳头状癌、甲状腺滤泡状癌）、尿路上皮癌（膀胱尿路上皮癌、上尿路上皮癌）。

7. 干扰物质研究：

1) 外源性干扰物质：评估FFPE样本在处理过程中可能受酒精、福尔马林和石蜡的影响，当酒精浓度 $\leq 1\%V/V$ 、福尔马林 $\leq 0.005\%V/V$ 、石蜡

≤1%V/V时，对本试剂盒的检测结果不产生干扰。

2) 内源性干扰物质：当待测样本中癌旁组织或坏死组织比例≤50%时，检测结果与对应肿瘤类型一致，本试剂盒可以稳定实现石蜡包埋组织样本的组织起源的判定。综合考虑，为保证试剂盒的性能稳定，建议待测样本癌旁组织或坏死组织比例不能超过40%。

8. 临床评价

本次临床试验三家中心共入选有效样本1010例。考核试剂检测结果与组织病理学检查结果之间一致性分析显示，阳性符合率为90.8%，阴性符合率为92.0%，总符合率达到90.9%。

【注意事项】

1. 本试剂盒结果会受到样本本身的来源、样本采集过程、样本质量、样本运输条件、样本预处理等因素影响，同时也受到 RNA 提取质量、实时荧光 PCR 仪型号、操作环境及当前分子生物学技术的局限性等限制，可能导致假阳性或假阴性的检测结果。使用者需了解检测过程中可能存在的潜在错误、准确性的局限性。

2. 检测所用的RNA的质量非常重要，RNA提取后应进行质控，确定质量，并应尽快进行试验，如不能马上进行试验，所提取RNA需保存在-70℃~-80℃，储存时间不超过6个月。

3. 一般RNA用量以20ng/孔为宜，但对于提取质量较差，应相应增加RNA用量。尤其是福尔马林固定的石蜡病理样本，由于福尔马林对RNA的交

联作用，该类样本中的RNA较易片段化和降解，尽管紫外分光光度计测量的浓度数值较高，但实际加入反应中的有效RNA量并不足够。

4. 本试剂盒所有试剂均经过特别配制，以用于上述检测。随意替换试剂盒中的任何试剂，都可能影响使用效果，不同批号试剂盒成分不可相互混用。避免在不必要的情况下冻融试剂盒中的试剂。

5. 在运输过程会有基因检测试剂附着在96孔板壁/膜上，因此使用前请离心，以保证PCR反应体系的体积，防止潜在的污染。

6. 实验过程中需全程带手套和口罩进行操作，样本处理所用的离心管及实验过程中使用的吸头应确保没有核酸酶污染，实验完毕后用10%次氯酸钠或75%酒精或紫外线灯处理工作台和移液器。

7. 所有化学药品都具有潜在的危险性。具有PCR实验室上岗证的人员才能使用本试剂盒。在首次使用本试剂盒前，公司技术支持人员对操作者进行培训。操作时，请穿着合适的实验室工作服、并佩戴一次性手套等防护性措施。产品在正确使用过程中不慎溅入眼内应立即用冲眼器或大量清水冲洗眼睛。

8. 所有检测样本和试剂盒中的对照品应视为具有传染性物质，操作和废弃物处理均需符合相关法规要求：卫生部《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

9. 临床实验室应严格按照《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号或现行有效版本）等有关分子生物学实验室、临床基因扩增实验室的管理规范执行。

【标识的解释】



: 怕雨;



: 向上;



: 易碎物品, 小心搬运。

【参考文献】

1. Anderson G G, Weiss L M. Determining tissue of origin for metastatic cancers: meta-analysis and literature review of immunohistochemistry performance[J]. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, 2010, 18(1):3-8.
2. 李汝懿, 陆建波. 基因表达谱在肿瘤病理诊断与鉴别诊断中的意义[J]. 实用肿瘤学杂志, 2015, 29(3):275-278.
3. 王奇峰, 徐清华, 陈金影, 等. 一种新型肿瘤组织起源分子标志物的建立与评价[J]. 中国癌症杂志, 2016, 26(10):801-812.
4. 中华医学会. 《临床技术操作规范-病理学分册》[M]. 人民军医出版社, 2004.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 杭州可帮基因科技有限公司

住所: 浙江省杭州市余杭区余杭经济技术开发区新颜路22号7幢301M

电话:

售后服务单位名称:

电话:

生产地址: 杭州市余杭区龙船坞路157号3幢5层502室;

杭州市余杭区龙船坞路157号5幢3层1309、1310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】

【说明书核准日期及修改日期】