

MT-1A、Epo 及 Septin9 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:MT-1A、Epo 及 Septin9 基因甲基化检测试剂盒(PCR 荧光探针法)

【包 装 规 格】 30人份/盒

【预 期 用 途】 本试剂盒用于体外定性检测人血浆中甲基化的MT-1A、Epo及Septin9基因。

该产品临床预期用于临床诊断建议进行食管镜检查同时因依从性差或身体条件不适合而暂时不能进行内镜检查的患者，相关病例应有食管癌相关症状、体征，如吞咽食物时有哽咽感、异物感、胸骨后疼痛或出现明显的吞咽困难，食管造影发现食管黏膜局限性增粗、局部管壁僵硬、充盈缺损或龛影等表现等。该产品不能替代食管镜检查，检查结果阳性不能确认病例为食管癌患者，检查结果阴性亦不能排除食管癌患者。该产品适用于食管癌的辅助诊断，不用于普通人群的肿瘤筛查。

根据《食管癌诊疗规范（2018年版）》，食管癌的高危因素为年龄40岁以上，长期饮酒吸烟、直系家属有食管癌或恶性肿瘤病史、具有上述癌前疾病或癌前病变者。早期食管癌的症状一般不明显，常表现为反复出现的吞咽食物时有异物感或哽咽感，或胸骨后疼痛。MT-1A基因是金属硫蛋白基因的一员，参与细胞增殖、分化和凋亡等，MT-1A基因的异常表达在多种人类肿瘤均有发现；人类Epo基因位于7号染色体长22区，通过表达Epo蛋白，发挥抗凋亡并维持细胞存活的作用；Septin9是Septin基因家族的一个成员，该基因家族至少有13个基因组成，它们编码保守的GTPase结构域，可以结合细胞骨架相关的蛋白质，和细胞分裂与肿瘤发生相关。研究发现，在食管癌患者血浆样本中甲基化的MT-1A、Epo及Septin9基因含量特征性增高。

【检 验 原 理】 MT-1A、Epo及Septin9基因甲基化检测试剂盒（PCR荧光探针法）包括两个步骤。步骤1，使用血浆处理试剂提取血浆中的游离DNA，然后用亚硫酸盐转化未发生甲基化的胞嘧啶，通过脱氨基反应产生尿嘧啶磺酸盐，发生甲基化的胞嘧啶则不会被亚硫酸盐转化；步骤2，亚硫酸盐转化的DNA（BisDNA）做四重PCR扩增，PCR反应中的阻断序列和探针能区分甲基化和非甲基化序列，甲基化序列会得到扩增，与甲基化MT-1A基因、Epo基因和Septin9基因序列特异性结合的荧光素探针可以在PCR反应中专一地检测出甲基化序列。内对照ACTB（β-actin）基因用于评估检测中DNA量是否足够。试剂盒中提供了阳性和阴性对照，两者在每一次检测中都需要同时加入。

【主要组成成分】

试剂	主要成分	规格/数量
PCR反应液	dNTPs、PCR Buffer、引物、探针和阻断序列	840μL×1 管
聚合酶	Taq DNA 聚合酶	45μL×1 管
阴性对照品	WBC DNA	2.1mL×3 管
阳性对照品	HeLa DNA、WBC DNA	2.1mL×3 管

以下试剂和耗材是本试剂盒不包含，但对该实验必需的：

1) 血浆游离DNA提取和亚硫酸盐转化试剂盒(试剂盒名称:核酸提取试剂；备案号：京经械备20140053；公司名称：博尔诚(北京)科技有限公司)；

2) 无水乙醇(分子生物级别，浓度高于 99.5%)；

3) 15 mL 聚丙烯离心管带有圆锥型底，无菌；

4) 2.0 mL 离心管，圆底带有联体螺旋型的密封盖；

5) 带有过滤装置的吸头，包括 2-100μL、50-1000μL 规格；

6) 存储 DNA 的 96 孔板;包括 0.1mL、0.2mL 规格；

7) 96 孔板密封膜；

8) 96 孔板密封膜的手动压膜器；

9) 可再封闭型塑料袋;10×15 cm；

10) 可竖立的 5mL 密封冻存管；

11) BDVacutainer® K₂EDTA 6mL 采血管

12) 一次性移液器，可以非无菌包装，长度 15cm，体干直径 5mm，能吸取 5mL 液体。

【储存条件及有效期】

试剂盒有效期为 12 个月。请勿使用过期的试剂。不同批次的试剂盒不能混用。

每一管 PCR 反应液开封后可在-25~-15℃保存2个月，冻融次数不超过两次，使用两次后剩余的残液应丢弃。

试剂盒于-25~-15℃条件下存储。可使用干冰或冷链-25~-15℃进行运输，不超过 7 天。

生产日期及失效日期详见产品标签。

【适 用 仪 器】 1.Applied Biosystems 7500 实时荧光定量 PCR 仪(Life Technologies Holdings Pte Ltd)

2.SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统(上海宏石医疗科技有限公司)

【样 本 要 求】

试剂盒的检测对象为亚硫酸盐处理后的 DNA，外周血的制备及血浆游离 DNA 的提取建议参照如下方式执行：

① 全血采集

•采血量:5 mL。

•采血方法:使用 K₂EDTA 抗凝采血管(BDVacutainer® K₂EDTA 6mL 采血管)采血。

•采集后的血样应立即离心制备血浆，如不能及时处理，应放入 2~8℃冰箱，且在 2~8℃温度下保存的时间不超过 8 小时，不得冰冻血样。

② 血浆样本的制备和血浆保存

•禁止使用离心机刹车(急停)功能，以防止破坏血细胞层。

•离心装有全血的采血管 12 分钟，离心力 1350±150rcf。从离心机中取出采血管，用一个干净的 15cm一次性移液管把血浆转移到聚丙烯材质、圆锥底的 15mL 离心管中。

•离心血浆 12 分钟，离心力 1350±150rcf。用新的一次性移液管或者血清移液管将血浆(至少 2mL)移入标记好的圆锥底的离心管中。

•制备好的血浆样本应立即放入-25~-15℃冰箱中，保存不超过 2 周，反复冻融不超过 1 次。

【检 验 方 法】

① 血浆游离 DNA 的提取

•使用博尔诚（北京）科技有限公司生产的核酸提取试剂。

•方法参照说明书的要求进行，取2mL血浆进行处理，最终BisDNA洗脱体积为37μL。

•若BisDNA不立即使用，可在2~8℃存储24小时，或在-25~-15℃存储72小时，反复冻融不超过1次。

② PCR检测

2.1. PCR预反应液的准备

• 根据反应样本量，融化相应管数的PCR反应液，一管PCR最多用于30个样本（包含阳性对照品和阴性对照品），涡旋混匀PCR反应液10~15秒，短暂离心。

• 每个PCR反应需要25.8μLPCR反应液和1.3μL聚合酶。按比例将相应体积的PCR反应液和聚合酶加入到2.0mL的离心管中。涡旋混匀PCR预反应液，短暂离心离心管，将管壁液滴离下来。

注意: 配制好的PCR预反应液应立即使用。PCR反应液和聚合酶使用完毕立即复冻。

2.2 PCR反应板准备 (Applied Biosystems 7500/SLAN-96S)

•将25μL PCR预反应液加至选定好96孔板孔中。加入25μL的BisDNA至PCR板对应的孔中。

•用MicroAmp® Optical Adhesive Film胶膜或与PCR反应板适配的条形管盖密封，1000±100rcf离心1分钟。密封后的PCR板可在2~8℃放置不超过4小时。

2.3 PCR扩增

•软件要求

PCR过程可使用Applied Biosystems 7500，该仪器适配软件为 V2.0.5及以上版本。

PCR过程可使用SLAN-96S，该仪器适配软件为V8.2.2软件及以上版本。

• PCR反应板加载

Passive Reference设置必须为“none”，Septin9选取FAM通道，MT-1A选取JOE通道，Epo选取CY5通道，ACTB选取ROX通道，如表1所示设置反应程序：

表1：反应程序					
步骤	描述	温度	时间	升/降温速率*	荧光信号收集
阶段1	活化	94℃	20分钟	40%	
阶段2	45个循环	62℃	5秒	80%	
		55.5℃	35秒	80%	√
		93℃	30秒	40%	
阶段3	降温	40℃	5秒	80%	

注：√代表荧光收集阶段 *：升降温速率在SLAN-96S PCR仪可采用默认模式。

③ 分析条件设置

3.1. Applied Biosystems 7500设置

• 设置基线10~22个循环，设置ACTB阈值20000，MT-1A阈值为70000，Epo阈值为40000，Septin9阈值140000。[*]

• 用对照品验证PCR反应的有效性：阳性对照品和阴性对照品的PCR结果均满足表2的参数要求时,则认为本次PCR反应有效。

3.2. SLAN-96S设置

•设置基线10~22个循环，设置ACTB阈值40，MT-1A阈值60，Epo阈值27，Septin9阈值80。[*]

• 用对照品验证PCR反应的有效性：阳性对照品和阴性对照品的PCR结果均满足表2的参数要求时,则认为本次PCR反应有效。

[*]：相同机型的不同机器，由于机器运行时间不同，分析时阈值可作适当调整。

表2：PCR反应有效性参数信息				
对照品结果	MT-1A结果	Epo结果	Septin9结果	ACTB结果
阳性对照品有效	Ct≤37.5	Ct≤37.5	Ct≤37.5	Ct≤29.5
阴性对照品有效	undetermined	undetermined	undetermined	Ct≤34.5

4 质量控制

4.1. 外源对照

该试剂盒包含阳性对照品和阴性对照品。应在每次反应中添加这些对照品以检测反应是否成功，同时确保反应的有效性。阳性对照品和阴性对照品的反应Ct值应该在有效范围内，如表2，如果反应Ct值在其有效范围之外，此次测试结果无效。

4.2. 内源对照

内源对照能够检测亚硫酸盐转化的ACTB（β-actin）DNA，同时能够检测样品是否满足实验要求（包括样本制备是否正确，样本DNA含量是否满足要求）。如表3,MT-1A、Epo、Septin9 PCR反应的结果与ACTB PCR结果的Ct值相关。如果ACTB PCR结果的Ct值超出有效范围，则反应无效。因为过高的ACTB Ct值表示BisDNA浓度过低或者PCR反应的抑制。

【阳性判断值】

使用本产品对798例临床样本的MT-1A、Epo、Septin9基因进行检测，为了确定最佳cutoff值，对检测数据进行了ROC分析，结合约登指数等统计指标，确定了试剂盒的cutoff值。

单次PCR结果的判定见表3：

表3：单次PCR反应的结果解释

单次PCR结果	MT-1A结果	ACTB结果
MT-1A 阳性	Ct≤37.5	Ct ≤ 34.8
MT-1A阴性	Ct>37.5或无Ct值	Ct ≤ 34.8
MT-1A无效	任意结果	Ct > 34.8

单次PCR结果	Epo结果	ACTB结果
Epo阳性	Ct≤37.5	Ct ≤ 34.8
Epo阴性	Ct>37.5或无Ct值	Ct ≤ 34.8
Epo无效	任意结果	Ct > 34.8

单次PCR结果	Septin9结果	ACTB结果
Septin9阳性	Ct≤43.0	Ct ≤ 34.8
Septin9阴性	Ct>43.0或无Ct值	Ct ≤ 34.8
Septin9无效	任意结果	Ct > 34.8

【检测结果的解释】

- 1 如果样本中MT-1A、Epo、Septin9中有一个、两个或三个检测为阳性，则判定该样本测试结果为阳性。
- 2 如果样本中MT-1A、Epo和Septin9同时检测为阴性，则判定该样本测试结果为阴性。
- 3 如果结果为其它情况，视为检测结果无效。

【检测方法的局限性】

- 1 只能用于体外诊断。
- 2 本试剂盒不包含血浆处理及亚硫酸盐转化试剂，使用博尔诚（北京）科技有限公司生产的核酸提取试剂。
- 3 该产品的使用者应该是接受过PCR反应训练的试验者。
- 4 由于食管癌检测依赖于样本中肿瘤DNA的量、所以可能受样本收集过程、样本储存方式、病人个体因素（如年龄，其它疾病）以及肿瘤级别影响。样本的收集请严格按照【样本要求】中的要求进行。
- 5 该产品在临床试验中针对结直肠癌病例特异度为56.9%，胃癌病例特异度为70.0%，肝癌病例特异度为78.9%，临床使用过程中应注意上述癌种的干扰，应结合临床症状、体征及其他诊断结果综合判断。

- 6 本试剂盒检测结果仅供临床参考，不得作为临床确诊的依据，应结合其他临床诊断结果进行判定。判断为阳性的患者，建议根据医生建议进一步检查以便确诊，判断为阴性的患者不排除患病的可能。

【产品的性能指标】

1 产品的性能指标

1.1 外观

外包装盒，组分齐全，包装外观清洁、无泄漏、无破损。标志、标签字迹清楚。

1.2 阳性符合率

检测6份企业阳性参考品P1-P6，P1-P3结果应为MT-1A、Epo和Septin9阳性；P4结果应为MT-1A阳性；P5结果应为Epo阳性；P6结果应为Septin9阳性；阳性符合率应为100%。

检测2份企业阳性参考品（临床样本）P7-P8，P7结果均应为MT-1A、Epo阳性，P8结果均应为Epo、Septin9阳性，阳性符合率应为100%。

1.3 阴性符合率

检测4份企业阴性参考品N1-N4，结果均应为MT-1A阴性、Epo阴性、Septin9阴性，阴性符合率应为100%。

检测4份企业阴性参考品（临床样本）N5-N8，结果均应为MT-1A阴性、Epo阴性、Septin9阴性，阴性符合率应为100%。

1.4 最低检出限

检测3份企业最低检出限参考品S1-S3，各重复3次，S1结果均应为MT-1A阳性、Epo阳性、Septin9阳性，S2结果均应为MT-1A阳性、Epo阳性，S3结果均应为Epo阳性。

在血浆中DNA浓度为6 copies/μL时，本试剂盒最低可检出0.75%的目标基因甲基化。

1.5 精密度

检测2份企业精密度参考品J1-J2，各10次重复，结果均应为MT-1A、Epo和Septin9阳性，J1和J2计算所测得MT-1A、Epo、Septin9和ACTB Ct值的变异系数（CV），均应不高于5%。

2 其他干扰

干扰实验显示，样本中含有以下干扰物：未甲基化DNA（100ng/mL）、胆红素（0.20mg/mL）、血红蛋白（10mg/mL）、甘油三酯（12mg/mL）、蛋白（血清白蛋白，40mg/mL）、红细胞（0.4% v/v）、K₂EDTA（20mg/mL）、胆固醇（5mg/mL）、尿酸（0.235mg/mL）和葡萄糖（10mg/mL），对检测结果无影响。

3 交叉反应

在以下临床诊断的疾病：胃癌、肝癌、大肠癌等患者中，已观察到阳性检测结果。

4 临床性能

通过在6家中心，临床试验共入组受试者 954 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85.5%（95%CI：82.8%，88.2%），临床特异度为93.6%（95%CI：90.3%，96.1%）。

【注 意 事 项】

1 本品仅用于体外诊断。

2 实验室注意事项

- 应减少实验样本中的交叉污染，包括DNA提取，亚硫酸盐转化和DNA洗涤等过程。
- 为防止在DNA提取过程中核酸酶混入样本，我们建议使用一次性的移液管和移液器头，这样可以避免不同样本间的交叉污染。检测实验应该由精通DNA提取和real-time PCR分析的专业人员完成。
- 为防止PCR扩增产物的污染，我们建议严格区分PCR步骤，分为PCR扩增前（血浆DNA的提取，纯化和PCR设置）和PCR扩增（如real-time PCR）。使用过的PCR平板应该置于一个不利于PCR产物扩散的地方，例如

使用过的PCR平板从PCR仪取出之后，应立即置于自封袋中，封紧，并丢弃在指定的容器中。绝不要把使用后的PCR平板放在PCR仪外面，也不要打开用过的PCR平板。

3 微生物及感染状态

产物中不含有任何具有感染性的物质，不会感染人体或其他动物。受检人血样应视为潜在的感染源，其操作应在具有生物安全标识和具有生物安全防护条件的微生物和生物医学实验室进行，以保护操作人员在工作时不会受到潜在感染源的影响。

【标识的解释】 无

【参 考 文 献】

- 1 Sawami Suzuki, Hiroko Nakano,et al. Epigenetic regulation of the metallothionein-1A promoter by PU.1 during differentiation of THP-1 cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 433 (2013) 349–353.
- 2 Katrin Steinmann,et al, Epigenetic Silencing of Erythropoietin in Human Cancers. Genes & Cancer 2(1) 65-73
- 3 Hiroaki Nagata,et al,Genome-wide screening of DNA methylation associated with lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma,Oncotarget, 2017,Vol.8, (No.23), p: 37740-37750
- 4 《食管癌 诊疗规范（2018年版）》

【基 本 信 息】

注册人/生产企业名称：博尔诚（北京）科技有限公司

住 所：北京市北京经济技术开发区宏达南路18号院3号楼10层

联系方式：客服热线：4006503186 邮政编码：100176

网 址：http://www.biochainbj.com/

售后服务单位名称：博尔诚（北京）科技有限公司

联系方式：客服热线：4006503186 邮政编码：100176

网 址：http://www.biochainbj.com/

生产地址：北京市北京经济技术开发区宏达南路18号院4号楼3层、2号楼501-504室、1幢-1层-101 A区和B区

生产许可证编号：京药监械生产许20100048号

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】国械注准20243401386

【说明书批准日期/生效日期及修改日期】2024年08月05日

【版本】V1.0