

SOX1 和 PAX1 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：SOX1 和 PAX1 基因甲基化检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

24 人份/盒、6 人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人宫颈脱落细胞中的 SOX1 和 PAX1 基因的甲基化状态。

本检测适用于 12 种高危 HPV（hrHPV）基因型（31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68 型）检测阳性的 30 岁及以上女性人群，帮助识别是否需要进行阴道镜检查，达到分流管理的目的。

宫颈癌是世界范围内最常见的妇科恶性肿瘤之一，持续性的高危型 HPV 感染则是导致宫颈上皮内瘤变及宫颈癌的主要原因。DNA 甲基化，即未甲基化胞嘧啶—磷酸—鸟嘌呤（Cytosine-phosphate-Guanosine, CpG）二核苷酸发生甲基化。肿瘤抑癌基因启动子的超甲基化，在宫颈癌发生发展的各个阶段，均有其特异性的改变模式^[1]；在进展的过程中，由于启动子的过甲基化，引起了不同肿瘤抑制基因的失活。表观遗传学改变的累加效应在宫颈由正常组织-癌前病变-宫颈癌的发展过程中有着重要的意义^[2-5]。因此，作为癌症发生的早期事件，在宫颈癌组织中，存在 SOX1 和 PAX1 等基因的启动子区域 CpG 岛的胞嘧啶发生甲基化，而正常宫颈组织中极少发生甲基化。因此将以上指标作为宫颈癌和癌前病变的生物标志物。

【检验原理】

本试剂盒采用的技术原理是甲基化特异性多重 PCR-荧光探针法。

本试剂盒包括三个步骤：DNA 提取和纯化、重亚硫酸盐转化和实时荧光 PCR。

步骤 1，DNA 提取和纯化：使用核酸提取试剂对宫颈脱落细胞进行酶裂解释放核酸，并通过吸附柱或磁珠分离纯化核酸。

步骤 2，重亚硫酸盐转化：对提取的 DNA 进行重亚硫酸盐转化处理，DNA 上未发生甲基化的胞嘧啶 C 因脱氨基反应变成尿嘧啶 U，而发生甲基化的胞嘧啶 C 则不会被重亚硫酸盐转化。

步骤 3，实时荧光 PCR：本试剂盒针对经过转化后的 DNA(bisDNA)序列设计特异性的引物和探针，以 bisDNA 为模板进行荧光 PCR 扩增，特异性结合发生甲基化的 SOX1 和 PAX1 基因。

本试剂盒以 ACTB 基因作为内标基因，用来评估样本 DNA 是否足量以及重亚硫酸盐转化质量是否合格。

【主要组成成分】

本产品由 PCR 反应液 I、PCR 反应液 II、DNA 聚合酶、空白对照和阳性对照组成，主要成分如表 1 所示：

表 1 试剂盒主要成分

组成	数量	装量		主要成分
		24 人份/盒	6 人份/盒	
PCR 反应液 I	1 管	476.4μL	119.1μL	脱氧核糖核苷三磷酸（dNTPs）、Buffer
PCR 反应液 II	1 管	69.6μL	17.4μL	目的基因和内标基因（ACTB）的引物和探针
DNA 聚合酶	1 管	6μL	1.5μL	DNA 聚合酶
空白对照	1 管	500μL	500μL	H ₂ O
阳性对照	1 管	100μL	20μL	含人 ACTB 基因质粒、人 SOX1 和 PAX1 基因甲基化序列质粒

说明：不同批号试剂盒中各组分不可互换使用。

需要但试剂盒中未提供的试剂

用途	试剂名称	试剂厂家	备案号
样本保存液 (二选一)	细胞保存液	潮州凯普生物化学有限公司	粤潮械备 20150018
	细胞保存液 PreservCyt Solution	豪洛捷医疗科技（北京）有限公司	国械备 20140197
DNA 提取 (二选一)	核酸提取或纯化试剂 (离心柱法 BSPC-D-M 型)	广州凯普医药科技有限公司	粤穗械备 20170053 号
	核酸提取或纯化试剂 (磁珠法 DR-4801-KZ 型)	潮州凯普生物化学有限公司	粤潮械备 20210003
重亚硫酸盐转化	核酸提取或纯化试剂 (离心柱法 D-D-M 型)	广州凯普医药科技有限公司	粤穗械备 20181080 号

【储存条件及有效期】

-20±5℃避光保存，有效期为 12 个月。

试剂盒冻融次数不得超过 6 次，应尽量避免反复冻融。

试剂盒采用蓄冷剂（干冰加冰袋）包装运输，运输温度范围为-75~0℃，运输时间不超过 100 小时。

生产日期和使用期限见标签。

【适用仪器】

实时荧光定量 PCR 仪：ABI 7500、SLAN-96S。

【样本要求】

1 适用的样本类型：人宫颈脱落细胞

1.1 样本的采集

按专用的细胞采集系统，采集人宫颈脱落细胞样本，保存于潮州凯普生物化学有限公司生产的细胞保存液（粤潮械备 20150018）或豪洛捷医疗科技（北京）有限公司生产的细胞保存液 PreservCyt Solution（国械备 20140197）。

1.2 样本的保存

在室温（10~30℃）下保存不应超过 4 周，在 2~8℃保存不应超过 12 周；如需保存 12 周以上，应在-15℃以下保存，冻融次数不超过 3 次。

2 DNA 提取液

2.1 提取

按照核酸提取或纯化试剂（离心柱法 BSPC-D-M 型）（粤穗械备 20170053 号）或核酸提取或纯化试剂（磁珠法 DR-4801-KZ 型）（粤潮械备 20210003）说明书提取临床样本基因组 DNA（推荐取至少 2mL 样本离心富集后提取），同时取 60μL 空白对照与样本一同参与提取过程。

将抽提好的 DNA 样本，用紫外分光光度计检测 DNA 浓度和纯度（OD260/OD280），DNA 浓度应 $\geq 30\text{ng}/\mu\text{L}$ ，DNA 纯度应在 1.6~2.1 之间。

2.2 保存

DNA 提取液在 2~8℃保存不超过一周或-15℃以下保存不超过 12 个月，冻融次数不超过 5 次。

3 DNA 重亚硫酸盐转化

3.1 转化

按重亚硫酸盐转化试剂（核酸提取或纯化试剂（粤穗械备 20181080 号））说明书对上述样本 DNA 提取液和空白对照提取液进行转化，最终使用 40μL TE 缓冲液进行洗脱。

3.2 保存

转化后 DNA 提取液在 2~8℃保存不超过一周或-15℃以下保存不超过 12 个月，冻融次数不超过 5 次。

【检验方法】

1 DNA 的提取

采用推荐的核酸提取试剂对待测样本和空白对照进行提取，紫外分光光度计检测样本 DNA 提取液的浓度与纯度。合格的样本 DNA，进行下一步转化；不合格的样本进行重新提取或重新采样后提取。推荐转化上样量为 800ng，建议转化上样量不低于 500ng。

2 重亚硫酸盐转化

采用推荐的重亚硫酸盐转化试剂对上述提取的合格的样本 DNA 和空白对照提取液进行转化，得到的样本 DNA 转化液和空白对照转化液进行 PCR 检测。

3 PCR 扩增

3.1 基因扩增试剂准备（在试剂准备区进行）

- 1) 每次 PCR 反应中，同时对空白对照转化液、待测样本 DNA 转化液和阳性对照进行检测。
- 2) 将 PCR 反应液 I、PCR 反应液 II、DNA 聚合酶和阳性对照取出，解冻后离心 30s，防止反应液残留在管盖。
- 3) 根据扩增用样本数量计算需要分装的反应液管数，如下所示：

反应液管数 (N) = 样本数 (n 管) + 阳性对照 (1 管) + 空白对照 (1 管)

将 PCR 反应液 I、PCR 反应液 II 与 DNA 聚合酶按下表 2 进行体系配制：

表 2 试剂配制用量

组成	取用量 (μL)
PCR 反应液 I	$19.85 \times N$
PCR 反应液 II	$2.9 \times N$
DNA 聚合酶	$0.25 \times N$
总体积	$23 \times N$

按上表配制混合均匀后，按照所需的反应液管数 N 分装到 PCR 反应管中，每管分装 23μL。

3.2 加样(在样本处理区进行)

分别加入 2μL 空白对照转化液、待检测样本 DNA 转化液和阳性对照，反应总体积为 25μL，反应管上做好记号，低速离心 30s，确保管壁上不沾有液滴。

3.3 PCR 扩增

仪器荧光通道设置：待测样本、空白对照、阳性对照荧光通道选择均按下表 3 进行设定。

表 3 反应液中各检测基因型通道

类型	目的基因	Reporter	Quencher
检测基因	SOX1	FAM	None
	PAX1	VIC/HEX	None
内控基因	ACTB	ROX	None

将加样后的 PCR 反应管置于荧光定量 PCR 仪上，设置如下程序（表 4）进行扩增。

表 4 PCR 扩增程序

步骤		温度	时间	循环数	是否收集荧光
1	预变性	95°C	10min	1	否
2	变性	95°C	20sec	45	否
3	退火	60°C	30sec		是

【阳性判断值】

1 Ct 值确定

自动设置基线，荧光阈值设定在 PCR 扩增的指数期，此处需手动设置，一般为扩增曲线升起的拐点处，阈值线与扩增曲线的交点即为 Ct 值。

2 空白、阳性对照

应在每次检测时进行空白、阳性对照试验，以检测反应的成功和确保反应的有效性。

空白、阳性对照 FAM、VIC/HEX 和 ROX 通道 Ct 应符合如下表 5 要求：

表 5 空白、阳性对照 Ct 要求

对照	FAM 和 VIC/HEX 通道	ROX 通道
阳性对照	$22 \leq Ct \leq 28$	$22 \leq Ct \leq 28$
空白对照	Undet 或 $Ct > 40$	

3 内标

除空白对照和阳性对照外，所有反应孔的内标信号（ROX 通道） $15 \leq Ct \leq 35$ 。

4 样本

空白、阳性对照和内标合格之后，依据表 6 和表 7 对样本检测结果进行判定：

表 6 基因甲基化检测结果判定

基因	探针标记	Ct 值	基因甲基化结果判读
SOX1	FAM	$Ct \leq 38.6$	阳性 (+)
		$Ct > 38.6$	阴性 (-)
PAX1	VIC/HEX	$Ct \leq 38$	阳性 (+)
		$Ct > 38$	阴性 (-)

表 7 样本检测结果判定

基因甲基化	检测结果判定
SOX1+ PAX1+	阳性
SOX1+ PAX1-	
SOX1- PAX1+	
SOX1- PAX1-	阴性

【检验结果的解释】

- 1 当样本检测结果为阳性时，表示受检者检测时患有宫颈癌前病变或早期宫颈癌的可能性较高，建议进行临床的确诊。
- 2 当样本检测结果为阴性时，表示受检者检测时患有宫颈癌前病变或癌变可能性较低，建议定期进行宫颈癌筛查。

- 3 若空白对照任何一个通道产生信号,则可能是由于环境或体系被污染所致,应对环境进行处理,消除污染后重新试验。
- 4 若阳性对照信号 Ct 值范围超出质控范围,则表明该试剂盒失效,需更换试剂盒重新试验。
- 5 若待测样本内控无 ROX 信号,但是目的基因信号有明显的扩增曲线,且 Ct 值 ≤ 35 ,说明反应体系中 ROX 信号可能被抑制,建议复测或重新抽提 DNA 后检测。
- 6 若样本内控 ROX 信号 Ct 值 >35 ,说明反应体系中 DNA 量较少,建议重新抽提 DNA 后检测。

【检验方法的局限性】

- 1 本试剂盒的检测结果仅供临床参考,不能单独作为确诊或排除病例的依据。检测结果为阳性的患者需接受进一步的临床确诊。
- 2 阴性结果不能完全排除相关基因甲基化的存在,样本中细胞过少,核酸过度降解或扩增反应体系中靶基因浓度低于检测限亦可造成阴性结果。
- 3 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。
- 4 本检测试剂检测范围仅包括说明书中明确包含的甲基化位点,不包括检测试剂盒申明之外的甲基化位点检测。

【产品性能指标】

- 1 外观:组分齐全、包装外观清洁、无泄漏、无破损;标志、标签字迹清楚。
- 2 阳性符合率:检测 6 份企业阳性参考品 P1-P6,相应甲基化基因的检测结果应为阳性。
- 3 阴性符合率:检测 6 份企业阴性参考品 N1-N6,检测结果应均为阴性。
- 4 检测限
 - 4.1 检测企业最低检出限参考品 L1-L3,相应甲基化基因的检测结果应为阳性。
 - 4.2 使用临床样本进行检测限研究,结果表明:本试剂盒检出限浓度为 10000 copies/ μL 总核酸背景下 1%的 PAX1 或 SOX1 甲基化 DNA。
- 5 精密度
 - 5.1 检测企业精密度参考品 R1,每份参考品重复检测 10 次,检测结果应为阳性,且 SOX1 和 PAX1 基因 Ct 值的变异系数 CV(%)应不大于 5.0%;检测企业精密度参考品 R2,每份参考品重复检测 10 次,检测结果应为阳性;检测企业精密度参考品 R3,每份参考品重复检测 10 次,检测结果应为阴性。
 - 5.2 通过不同地点、人员、轮次、日间和批次对中高阳性、临界阳性以及阴性样本进行连续 20 天精密度研究,本试剂盒检测结果的 Ct 值变异系数(CV)均不大于 5.0%。
- 6 分析特异性
 - 6.1 干扰试验:本试剂盒对内源性干扰物 0.15g/mL 血红蛋白、 1×10^6 个/mL 白细胞和 50%宫颈粘液以及外源性药物 0.15g/mL 消糜栓、5%阴道用润滑剂、5%苦参类洗剂、20mg/mL 替硝唑阴道片、174mg/mL 保妇康栓、100mg/mL 重组干扰素 $\alpha 2b$ 凝胶进行了干扰实验,检测结果显示这些干扰物对试剂盒检测结果均无影响。

6.2 交叉反应: SOX17、DXL1、ZNF671、Twist1、RASSF1A、Septin9 常见甲基化基因无交叉反应。同时本试剂盒与 HPV 高危型 (HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68)、梅毒螺旋体、阴道毛滴虫、解脲支原体、人型支原体、生殖支原体、淋病奈瑟菌、白色念珠菌和沙眼衣原体等均无交叉反应。

7 临床性能指标: 在 3 家临床试验机构进行临床试验, 共纳入 990 例病例, 针对 30 岁及以上 12 种非 16/18 型 hrHPV 感染的人群, CIN2+水平, 试剂盒的临床灵敏度为 86.57%, 临床特异性为 92.38%; CIN3+水平, 试剂盒的临床灵敏度为 94.74%, 临床特异性为 86.34%。

【注意事项】

- 1 本品仅用于体外诊断。
- 2 实验请严格分区操作, 各区物品不得交叉使用, 每个区使用专用的仪器和设备。
- 3 使用不含荧光物质的一次性手套、一次性专用离心管、自卸式移液器和带滤嘴吸头。
- 4 每次实验应设置空白对照、阳性对照。试剂使用前应在常温下充分融化并混匀, PCR 反应混合液应避光保存。
- 5 所有化学药品都具有潜在的危险性。实验完毕用 10%次氯酸处理工作台和移液器, 使用过的试剂盒为临床废弃物, 应该妥善处理。
- 6 实验前请仔细阅读说明书, 并严格参照说明书要求进行实验。
- 7 临床实验室应严格按照《医疗机构扩增实验室管理办法》(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。

【参考文献】

- [1] Andrew P. Feinberg, Bert Vogelstein. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts[J]. Nature, 1983, 301(5895):89.
- [2] Szalmás A, Kónya J. Epigenetic alterations in cervicvical carcinogenesis[J]. Seminars in Cancer Biology, 2009, 19(3):144.
- [3] Koeneman M M, Kruitwagen R F, Nijman H W, et al. Natural history of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a review of prognostic biomarkers[J]. Expert Review of Molecular Diagnostics, 2015, 15(4):1.
- [4] Siegel E M, Riggs B M, Delmas A L, et al. Quantitative DNA Methylation Analysis of Candidate Genes in Cervical Cancer[J]. Plos One, 2015, 10(3):e0122495.
- [5] Sakane J, Taniyama K, Miyamoto K, et al. Abstract 289: Aberrant DNA methylation of DLX4 and SIM1 is a predictive marker for disease progression of uterine cervical low-grade squamous intraepithelial lesion[J]. Diagnostic Cytopathology, 2014, 43(6):462.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 广州凯普医药科技有限公司

住所: 广州市黄埔区九龙镇中新知识城凤凰三横路 71 号 2 号试剂车间四楼

联系方式： 传真：

售后服务单位名称：

联系方式： 传真：

生产地址：广东省广州市黄埔区九龙镇中新知识城凤凰三横路 71 号生产实验楼 3 层、6 层 A 区，2 号试剂车间 1 至 4 层，仓库 1 层 A 区、2 层 B 区、3 层 B 区

生产许可证编号：粤食药监械生产许20173077号



【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准20243401719

【说明书批准日期/生效日期及修改日期】

仅供凯普合作商备案使用，其他用途无效