

人类 SDC2 和 TFPI2 基因甲基化联合检测试剂盒

（荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】

通用名称：人类 SDC2 和 TFPI2 基因甲基化联合检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

24 测试/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测人粪便样本中肠道脱落细胞的 SDC2 和 TFPI2 基因的甲基化。本产品适用于临床医师建议做肠镜检查的，但因病人依从性差或其它医学原因无法做肠镜检查患者的辅助诊断，不能作为肿瘤早期诊断或确诊的依据。检测结果仅供临床参考，具体临床应用时，临床医生必须结合病例实际情况判断。

DNA 甲基化是表观遗传学修饰的其中一种，全基因组低甲基化和启动子区 CpG 岛高甲基化是肿瘤组织最常见的生物学现象。研究发现，基因启动子的甲基化修饰是肿瘤发生的早期事件，因此可以通过体外的粪便样本的遗传物质甲基化来预测结直肠癌癌变情况。SDC2 是一种细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白聚糖，SDC2 通过调节结直肠癌细胞中的细胞粘附来促进结直肠癌细胞增殖和致瘤活性。TFPI2 是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂，能够抑制癌细胞的细胞外基质的降解及癌细胞体外克隆形成和增值。SDC2 和 TFPI2 基因在结直肠癌组织中的甲基化水平显著高于正常组织，研究表明两者可以作为结直肠癌早期癌症的发生的生物分子标志物。

【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。

本产品基于实时荧光 PCR 技术实现对粪便样本中 SDC2 和 TFPI2 基因甲基化的检测。从人粪便样本中获得肠道脱落细胞基因组 DNA，然后用重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。用三重 PCR 扩增来测定亚硫酸盐转化后的 DNA (bisDNA)，从而检测发生甲基化的 SDC2 基因 DNA 片段（FAM 信号通道）和 TFPI2 基因 DNA 片段（ROX 信号通道）以及内控基因 ACTB（VIC 信号通道）。其中 ACTB（ β -Actin）基因为常用管家基因，用于评估检测中样本 DNA 含量和质量，在每一次检测中都同时检测阳性对照和阴性对照。

【主要组成成分】

表 1 试剂盒组成

序号	组分	主要成分	规格	数量
1	CRC 反应液 A	2×Buffer	360μL/管	1 管
2	CRC 反应液 B	引物、探针	120μL/管	1 管
3	CRC 阳性对照	CRC 阳性质粒和 ACTB 内参质粒	80μL/管	1 管

4	CRC 阴性对照	TE 溶液	160μL/管	1 管
---	----------	-------	---------	-----

备注：① 不同批次的试剂不可混合使用。

②本试剂盒不含提取成分，保存样本推荐使用康为世纪粪便 DNA 样本保存管（5 ml）（货号 CW2654）；核酸提取推荐使用核酸提取或核酸纯化试剂盒（康为世纪，货号：CWY121S，苏泰械备 20200971 号）；DNA 重亚硫酸盐修饰推荐使用甲基化检测样本前处理试剂盒（简石生物，货号：JSM530，浙甬食药监械生产备 20220001）。

【储存条件及有效期】

- 储存条件：-18℃以下。有效期为 12 个月。
- 生产日期和使用期限见标签。
- 试剂盒冻融次数不得超过 6 次。试剂盒开封后置于-18℃以下保存，不影响有效期。
- 试剂盒用泡沫箱加冰袋干冰密封运输。

【适用机型】

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

全自动医用荧光 PCR 分析系统（型号 Gentier 96R，西安天隆科技有限公司）

【样本要求】

- 样本的收集和保存

1）样本的收集：取 0.5 g 左右新鲜的粪便样本或加入新鲜的粪便样本至保存液管 2.5mL 的刻度线上，将其放入装有细胞保存液的保存管中，避免液体溅出（建议平行取两份，以备复查）；

- 取样要求：

- 排便习惯大于 1 次/天时，请确保在当天第一次排便时采样；
- 粪便样本为水样便时请勿采样；
- 女性请避免在生理期采样；
- 采样前 24 h 内，请避免食用过度油腻的食物。

3）样本保存：用细胞保存液保存的样本可在室温下保存和运输，总时间不应超过 3 个月；若不能及时处理，可于 -20℃±5℃保存 12 个月，冻融次数不超过 5 次。提取后的粪便 DNA 建议立即进行纯化，否则请于-20±5℃保存，保存时间不超过 1 年。粪便 DNA 应避免反复冻融，冻融次数不超过 5 次。提取并纯化（亚硫酸盐）处理完的 DNA 建议立即检测。

【检验方法】

1 试剂准备（在试剂准备区进行）

1.1 从试剂盒中取出试剂盒组分，使其恢复到室温，振荡摇匀待用；

1.2 根据测试数（测试数=n+2，其中 n 表示待测样本数量，另外两份为阴性对照品、阳性对照品）配制 PCR 反应液，反应液配制如表 2 所示：

表 2 PCR 反应液配制表

CRC 反应液 A（μL）	CRC 反应液 B（μL）	总体积（μL）
15×（n+2）	5×（n+2）	20×（n+2）

1.3 配制分装完成后，瞬时离心，并做好标记，然后转移至下一实验区。

2 样本处理（在样本处理区进行）

2.1 样本前处理

将采集好的样本用振荡器震荡制成样本悬浮液。

2.2 核酸提取

按照推荐的核酸提取试剂说明书对待测粪便样本和阴性对照进行提取，获得核酸提取液进行下一步核酸转化处理。

2.3 重亚硫酸盐处理

按照推荐的核酸纯化试剂说明书对核酸提取液（包含阴性对照）进行转化，获得核酸转化液，即可用于 SDC2、TFPI2 基因甲基化检测。

2.4 加样

向已分装好反应液的各反应管/板分别按顺序依次加入处理好的样本核酸转化液和阴性对照 NC、阳性对照 PC 各 10μL。加样后，确定盖好管盖或封膜，混匀后短暂离心 30 s（避免有气泡，如果有气泡，用手指轻弹，重新瞬时离心），立即进行 PCR 扩增反应。

注：加样顺序建议按照阴性对照、待测样本、阳性对照，避免造成样本污染。

3 PCR 扩增（在扩增区进行）

3.1 将 PCR 管放入仪器样本槽中，根据不同实时荧光 PCR 仪使用说明操作，按照表 3 和表 4 方法设定反应程序：

表 3 各靶基因检测荧光通道

基因	SDC2	TFPI2	ACTB
信号通道	FAM	ROX	VIC

表 4 PCR 扩增程序

阶段	温度（℃）	时间	荧光采集	循环数
预变性	95	5 min	/	1
PCR	95	15s	/	45
	57	30s	采集	
冷却	35	10s	/	1

4 基线、阈值设定

SLAN-96S 机型结果读取时，基线和阈值为仪器默认设置，无需更改；Gentier 96R 机型结果读取时，PCR 扩增程序结束后，在菜单栏点击“分析设置”，在分析设置里勾选“高敏模式”，其余基线和阈值为仪器默认设置，无需更改。

5 质量控制：

5.1 阴性、阳性对照

本试剂盒中阴性对照、阳性对照各通道检测信号 Ct 值应符合表 5 要求：

表 5 阴性、阳性对照检测信号 Ct 值要求

质控结果	FAM	VIC（内参）	ROX
------	-----	---------	-----

阴性对照	“No Ct”或Ct =45	“No Ct”或Ct≥37	“No Ct”或Ct = 45
阳性对照	Ct <33，且有较好的对数增长曲线。	Ct <33，且有较好的对数增长曲线。	Ct <33，且有较好的对数增长曲线。

5.2 内参质控

每个 PCR 扩增反应管内除待检测项目的引物探针外，还含有内参的引物探针，用于质控提取、PCR 反应过程及样本本身。

表 6 内参检测结果和质控结果

内参	Ct 值范围	结果
	有明显的“S”型荧光扩增曲线，且 Ct<37	样本合格
	Ct≥37 或无扩增	无效样本

【阳性判断值】

- 1.内参质控合格：样本处理过程、加样及 PCR 试剂满足要求。
- 2.内参质控无效：样本处理过程、加样及 PCR 试剂不满足要求，不确定是否有检测项目检出，需重新检测。
- 3.需要重新检测的情况：当内参质控无效或无结果情况出现，需要用剩余样本进行重新检测。
- 4.阴性对照、阳性对照和内控合格之后，则可按照表 7 对样本检测结果进行判定。

表 7 样本检测结果判定

结果（阴性对照、阳性对照和内控质控合格）		样本检测结果判定
SDC2 阳性、 TFPI2 阳性	Ct（FAM）<38	阳性
	Ct（ROX）<38	
SDC2 阳性、 TFPI2 阴性	Ct（FAM）<38	
	Ct（ROX）≥38 或无扩增	
SDC2 阴性、 TFPI2 阳性	Ct（FAM）≥38 或无扩增	阴性
	Ct（ROX）<38	
SDC2 阴性、 TFPI2 阴性	Ct（FAM）≥38 或无扩增	阴性
	Ct（ROX）≥38 或无扩增	

【检验结果的解释】

1. 若样本检测结果为阳性，表示受检者取样时患有结直肠癌或癌前病变的风险较高，建议进行肠镜等其他检查以确诊。
2. 若样本检测结果为阴性，表示受检者取样时患有结直肠癌或癌前病变的风险较低，但并不能完全排除疾病风险，必要时仍应建议进行肠镜检查。
3. 若阴性对照各通道信号 Ct 值超出表 5 的范围，则可能是由于环境或试剂被污染所致，此次结果无效，应重新换一个环境进行检测或对环境进行处理，消除污染后重新检测。
4. 若阳性对照各通道信号 Ct 值超出表 5 的范围，则表明该试剂盒失效，需更换试剂盒重新检测。
5. 若样本内控无信号，但是目的基因信号正常，说明反应体系中内控信号可能被抑制，建议重新进行 PCR 检测或重新提

取、转化 DNA 后检测。

6. 若样本内参信号有扩增，但 Ct 值>37，说明反应体系中 DNA 量不足，建议重新提取、转化 DNA 后检测或重新取样后检测。

7. 若样本内控信号及检测信号都不升起则表明此反应孔漏加 DNA 或样本不合格，此样本应重新检测或重新取样后检测。

【检验方法的局限性】

1. 使用本试剂盒进行检测，仅限于本说明书规定的样本类型及适用机型。

2. 本试剂盒检测结果不得直接作为临床确诊或排除病例的依据，仅供临床医师参考，应结合其他相关医学检查结果进行综合分析。

3. 不合理的样本采集、转运及处理、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. 检测结果为阴性时，也不能完全排除患结直肠癌的可能。样本中肿瘤细胞过少，样本处理不当造成的核酸降解都可能造成假阴性的结果。

【产品性能指标】

1.外观：外包装品名、批号、生产日期、失效日期等信息清楚、说明书清楚完整；各试剂外观应完整，标签应清晰无破损，试剂（盒）应组分完全。

2.准确性（阳性参考品符合率）：检测企业参考品盘中的 4 份阳性参考品 CRC P1~CRC P4，检测结果均应为阳性。

3 特异性（阴性参考品符合率）：检测企业参考品盘中的 5 份阴性参考品 CRC N1~CRC N5，检测结果均应为阴性。

4.精密性:检测企业精密性参考品 CRC R1 和 CRC R2,各 10 次的检测结果应均为阳性,且 Ct 值的变异系数(CV,%)应不高于 5.0%。

5.最低检测限：检测企业参考品盘中 1 份最低检测限参考品 CRC L 10 次，检测结果均应为阳性。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅限于体外诊断使用，实验结果仅供临床参考，不作为治疗或其它临床管理的唯一依据。

2. 操作前请仔细阅读本说明书，并严格按照说明书要求进行操作。

3. 实验前请熟悉和掌握需使用的检测仪器的操作方法和注意事项。

4. 操作人员应经过专业培训，具有一定经验和操作技能。

5. 每次实验应设置阴、阳性对照。试剂使用前应在常温下充分融化并混匀。

6. 临床样本的处理需要在生物安全柜中进行。

7. 实验过程中使用不含荧光物质的一次性手套（经常替换）、一次性专用离心管、自卸式移液器和带滤嘴吸头。

8. 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。不要使用超过有效期的试剂。

9.操作和废弃物处理均需符合相关法规要求：卫生部《微生物生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

【参考文献】

1. 白雪,陈晶. DNA 甲基化与消化系统恶性肿瘤的关系[J]. 肿瘤研究与临床,2018(09).

2. Jianping Wang, Side Liu, et,al. Robust performance of a novel stool DNA test of methylated SDC2 for colorectal cancer detection: a multicenter clinical study.[J].Clinical epigenetics,2020(1).

3. Tae Jeong Oh, Hyun Il Oh, et,al. Feasibility of quantifying SDC2 methylation in stool DNA for early detection of colorectal cancer. Clinical Epigenetics (2017) 9:126.

4. Sabine C.G., Mashaal D, Joo M.Y, Kelly E,et,al. Methylation of TFPI2 in Stool DNA: A Potential Novel Biomarker for the Detection of Colorectal Cancer.. Cancer Res. 2009 June 1; 69(11): 4691–4699.

【企业基本信息】

注册人名称：厦门腾基医疗科技有限责任公司

注册人住所：厦门市海沧区翁角西路 2060 号厦门生物医药产业园 B6 第四层

注册人联系方式：0592-6081428

售后服务单位名称：厦门腾基医疗科技有限责任公司

售后服务单位联系方式：0592-6081428

受托企业名称：北京金豪制药股份有限公司

受托企业住所：北京市北京经济技术开发区运成街 7 号 1 号楼

受托企业联系方式：010-67878866

受托企业生产地址：北京经济技术开发区凉水河一街 7 号院三区 2 号楼 A 楼、三区 12 号楼 A 楼、三区 12 号楼

B 楼、三区 13 号楼 A 楼

受托企业生产许可证编号：京药监械生产许 20050017 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】