

Septin9 和 BCAT1 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】

通用名称：Septin9 和 BCAT1 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

30 测试/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测人血浆中 Septin9 和 BCAT1 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。

近年来多项研究表明结直肠癌的发生、发展与 DNA 甲基化密切相关。高度保守的三磷酸鸟苷结合蛋白 septin 家族成员之一 Septin9（胞裂蛋白 9）基因（Septin9）和支链氨基酸转氨酶 1 基因（BCAT1）均为肿瘤抑癌基因，启动子区 CpG 岛高度甲基化导致基因转录功能受阻，使得基因表达异常，造成抑癌功能丧失。研究发现，结直肠癌患者血浆样本中的 Septin9 和 BCAT1 基因甲基化程度明显高于正常人血浆中的水平，可以作为结直肠癌早期癌症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 技术实现对血浆样本中 Septin9 和 BCAT1 基因甲基化的检测。从人血浆样本中获得游离核酸 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，而发生甲基化的胞嘧啶则不会被亚硫酸盐转化。用三重 PCR 扩增亚硫酸盐转化后的 DNA（BisDNA），从而检测发生甲基化的 Septin9 基因 DNA 片段（FAM 信号通道）和 BCAT1 基因 DNA 片段（ROX 信号通道）以及内控基因 ACTB（VIC/HEX 信号通道）。其中 ACTB（ β -Actin）基因为常用管家基因，用于评估样本 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	SAB 反应液 A	qPCR Mix	750 μ L/管	1
2	SAB 反应液 B	引物、探针	300 μ L/管	1
3	SAB 阳性对照	Septin9、BCAT1 基因甲基化 DNA	100 μ L/管	1
4	SAB 阴性对照	Septin9、BCAT1 基因未甲基化 DNA	100 μ L/管	1

注：不同批号试剂盒中各组分不可混用。

需自备的试剂盒及耗材：

- 1.本试剂盒不含提取成分，推荐使用江苏康为世纪生物科技股份有限公司生产的核酸提取或纯化试剂（备案号：苏秦械备 20190265 号）或恺硕生物科技（厦门）有限公司生产的核酸提取试剂（备案号：闽厦械备 20190246 号）；
- 2.亚硫酸盐转化试剂盒推荐使用简石生物技术(浙江)有限公司生产的甲基化检测样本前处理试剂盒（备案号：浙甬械备 20210375）或 ZYMO RESEARCH 公司生产的 EZ DNA Methylation-Gold™ Kit；
- 3.无水乙醇。
- 4.采血管：含 EDTA 抗凝剂的真空采血管（BD Vacutainer®，国械注进 20152222083），或游离 DNA 采血管（康为世纪，苏械注准 20192220059）

【储存条件及有效期】

- 1.储存条件：-20 $\pm$ 5℃保存，有效期为 12 个月。
- 2.生产日期和使用期限见标签。
- 3.试剂盒冻融次数不得超过 7 次。试剂盒开封后置于-20 $\pm$ 5℃下保存，不影响有效期。

【适用仪器】

西安天隆科技有限公司全自动医用 PCR 分析系统 Gentier 96R、上海宏石医疗科技有限公司全自动医用 PCR 分析系

统 SLAN-96S。

【样本要求】

- 1.适用样本类型：适用于人血浆样本
- 2.采集：采集受检者静脉血 5mL（或 10mL），收集于含有 EDTA 抗凝剂的采血管或游离 DNA 采血管中，立即轻轻颠倒混合 5~10 次，使保护剂与静脉血充分混匀，5~10 分钟即可离心分离血浆。
- 3.血浆分离要求：使用普通 EDTA 真空采血管采集后的血样应立即分离血浆，若不能立即分离血浆，应该在 2~8℃保存，保存时间不超过 4 小时；使用游离 DNA 采血管采集后的血样可以室温保存 4 天。不得冰冻血样。
- 4.样本保存：分离后血浆在 2~8℃保存，保存期不应超过 24 小时，在-20±5℃保存不超过 30 天，血浆样本仅可冻融 1 次；-70℃以下长期保存。

【检验方法】

1.血浆游离 DNA 的提取转化（在样本处理区进行）

- 1.1 提取纯化：取 2mL 血浆按照游离 DNA 提取试剂盒说明书的操作步骤进行，最后用 50μL 洗脱缓冲液进行洗脱，获得核酸提取液进行下一步核酸转化处理。
- 1.2 亚硫酸盐转化：取 20μL 纯化后的核酸按照亚硫酸盐转化说明书操作步骤进行，最后根据需要加入适量体积（推荐 20μL）洗脱液洗脱 DNA，即为 BisDNA。
- 1.3 若 BisDNA 不立即使用，可在 2~8℃储存 24 小时，或-20±5℃储存 72 小时，不要反复冻融。
- 1.4 阳性对照和阴性对照不参与提取过程，直接取相应量按照亚硫酸盐转化操作说明书进行。

2.PCR 检测

2.1 试剂准备（在试剂准备区进行）

- 2.1.1 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；
- 2.1.2 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 预混液，反应液配制如表 2 所示：

表 2 PCR 预混液配制表

SAB 反应液 A(μL)	SAB 反应液 B(μL)	总体积 (μL)
25× (n+2)	10× (n+2)	35× (n+2)

- 2.1.3 分别取 35μL 混匀后的 PCR 预混液分装于 PCR 反应管，盖上盖子，瞬时离心，然后转移至加样区。
 - 2.2 样本加样（在样本处理区进行）
 - 2.2.1 分别取 15μL 待检样本、阴性对照和阳性对照的 BisDNA 加到不同的 PCR 反应管中，加样结束后应盖紧 PCR 反应管，每个 PCR 反应管内液体的体积为 50μL。
 - 2.2.2 加样后将 PCR 反应管，上下颠倒混匀，瞬时离心，转移至扩增区。
- 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。

2.3 PCR 扩增（在扩增间进行）

- 2.3.1 按照表 3 方法设定反应程序：

表 3 PCR 扩增程序

阶段	温度	时间	循环数
第一阶段	95℃	5 分钟	1
第二阶段	95℃	15 秒	45
	57℃（FAM、VIC/HEX、ROX 采集荧光信号）	40 秒	

3.基线、阈值设定

天隆检测仪：判读前结果分析，使用时可以选择高敏模式进行分析或者基线取 10~35 个循环的荧光信号，阈值可以根据仪器设置自动阈值或噪音情况调整；设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线（无规则的噪音线）的最高点，且正好达到阳性对照曲线的拐点为准。

宏石检测仪：分析运行结果，将基线的起始点设为第“6”个循环，终点设为第“15”个循环，设置 Septin9、BCAT1 阈值 0.01，ACTB 阈值 0.02(可视具体状况进行微调，一般以设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线（无规则的噪音线）的最高点，且正好达到阳性对照曲线的拐点为准）。

4.质量控制：

阳性对照：FAM 通道 Ct 值≤38，VIC/HEX 通道 Ct 值≤35，ROX 通道 Ct 值≤38，并呈典型的 S 型扩增曲线。

阴性对照：FAM 和 ROX 通道无 Ct 值，且无典型的 S 型扩增曲线，VIC/HEX 呈典型的 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35。

【阳性判断值】

待测样本内标 ACTB（VIC/HEX 通道）应有典型的 S 型扩增曲线升起，且 Ct 值<35；若样本内标 ACTB（VIC/HEX 通道）通道 Ct 值≥35 或无扩增，说明加入的 DNA 含有 PCR 抑制剂或 DNA 浓度过低，需要重新提取或稀释 DNA 后再检测；若相应管内 FAM 信号和 ROX 有扩增曲线，结果仍为可信。

待测样本内控判读合格之后，则可按照表 4 对样本检测结果进行判定。

表 4 样本检测结果判定

结果（阴性对照、阳性对照和内标质控合格）		样本检测结果判定
Septin9 阳性、BCAT1 阳性	Ct（FAM）<43	阳性
	Ct（ROX）<41	
Septin9 阳性、BCAT1 阴性	Ct（FAM）<43	
	Ct（ROX）≥41 或无扩增	
Septin9 阴性、BCAT1 阳性	Ct（FAM）≥43 或无扩增	阴性
	Ct（ROX）<41	
Septin9 阴性、BCAT1 阴性	Ct（FAM）≥43 或无扩增	
	Ct（ROX）≥41 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 值超出质量控制要求，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 值超出各通道要求，则表明该试剂盒失效，需更换试剂盒重新检测。
5. 若样本内控信号及甲基化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。样本中游离核酸浓度过低，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.阳性参考品符合率为 100%。
- 3.阴性参考品符合率为 100%。
- 4.精密性：精密性参考品重复检测 10 次，FAM、VIC/HEX 和 ROX 通道的 Ct 值变异系数（CV%）均应小于 5%。

5.最低检出限：检测最低检出限参考品，其检测结果均为阳性。

【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，SAB 反应液 B 应避光保存。
- 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《微生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。
- 10.游离 DNA 提取洗脱步骤使用的洗脱缓冲液体积 50μL 为推荐用量，可根据需要以及不同提取试剂盒的推荐量调整。

【参考文献】

- 1.Colorectal Cancer Screening. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology.
- 2.Jedi M, Young GP, Pedersen SK, et al. Methylation and gene expression of BCAT1 and IKZF1 in colorectal cancer tissues[J]. Clin Med Insights Oncol, 2018, 12: 1179554918775064. DOI:10.1177/1179554918775064.
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. Sun J, Fei F, Zhang M, et al. The role of mSEPT9 in screening,diagnosis, and recurrence monitoring of colorectal cancer [J]. BMC cancer, 2019, 19(1): 450.
- 5.高海锋.外周血 Septin9 基因甲基化和血清 CA199 联合检测在结直肠癌筛查中的诊断价值[J].检验医学与临床 2022 年 19 卷 4 期, 526-529 页, ISTIC CA, 2022;云南省昆明市卫生健康委员会卫生科研课题项目.DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.04.023.

【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 号楼第 4 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 12 号楼、2 号 A 楼、13 号 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】

【说明书批准日期/生效日期及修改日期】