

人类 SDC2 基因甲基化检测试剂盒

（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】

人类 SDC2 基因甲基化检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

12 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒适用于体外定性检测人类粪便样本中 SDC2 基因的甲基化。

本试剂盒检测结果适用于临床医生建议做肠镜检查的患者的辅助诊断，不能作为肿瘤早期诊断或确诊的依据，仅作为辅助诊断供临床医生参考。临床医生需结合病例的实际情况进行判断，不能以本试剂盒检测结果作为临床诊断的唯一依据。

DNA 甲基化是指在甲基转移酶的催化下，DNA 的 CG 二核苷酸中的胞嘧啶被选择性的添加甲基，形成 5-甲基胞嘧啶，常见于基因的 5'-CG-3'序列，对基因的表达调控具有重要作用。DNA 高度甲基化可诱导抑癌基因沉默，在多种癌症中均有发现，且多数发生在肿瘤早期。

【检验原理】

本试剂盒针对人类 SDC2 基因甲基化序列，设计特异性引物和探针组合，特异性的检测 SDC2 基因存在甲基化与否。在反应体系中含有模板的情况下，PCR 反应得以进行并释放荧光信号。利用仪器对 PCR 过程中相应通道的信号强度进行实时监测和输出，实现检测结果的定性分析。根据扩增曲线及 Ct 值结果，进行结果判读。

本试剂盒为了检测 SDC2 基因启动子区域甲基化的情况，需使用推荐的粪便 DNA 提取试剂盒和亚硫酸氢盐转化试剂盒，从粪便样本中提取 DNA 后，再将提取所得 DNA 经过硫化、脱氨基、脱硫等化学反应，使没有甲基化的胞嘧啶（C）转化为尿嘧啶（U），而已甲基化的胞嘧啶则不发生转化，从而特异性地区分甲基化和非甲基化的靶标产物。

本试剂盒使用 TaqMan 荧光探针 PCR 技术，引物探针序列包含 SDC2 基因启动子区域的 CpG 位点，能特异地和发生甲基化的 DNA 序列结合扩增，并产生荧光信号；未发生甲基化的转化后序列则不能与其结合。另外，通过设计保守区域的引物来扩增内参基因 ACTB，以此评估人源粪便 DNA 样本的质量是否合格。

【主要组成成分】

1. 试剂盒中包含的试剂组份

试剂盒主要由 SDC2 PCR 反应液、ZYMT-044Taq 酶、ZYMT-044 对照品 A、ZYMT-044 对照品 B 和 ZYMT-044 空白对照组成，具体组成见表 1。

表 1：试剂盒组成

管号	标签名称	主要组成成分	装量规格
1	SDC2 PCR 反应液	PCR 缓冲液、dNTPs、参比染料 ROX、SDC2 和 ACTB 基因特异性引物和探针	1 管（290μL）
2	ZYMT-044 Taq 酶	DNA 聚合酶	1 管（20μL）
3	ZYMT-044 对照品 A	阳性细胞系 DNA	1 管（100μL）
4	ZYMT-044 对照品 B	阴性细胞系 DNA	1 管（100μL）
5	ZYMT-044 空白对照	Tris-HCl 缓冲液	1 管（100μL）

2. 以下仪器试剂耗材是本试剂盒不包含，但对实验必须的：

·仪器类：台式离心机、磁力架、移液器
·试剂耗材类：粪便采集套装（友芝友医疗科技股份有限公司，鄂汉械备 20220157 号）、粪便 DNA 提取试剂盒（磁珠法粪便和土壤基因组提取试剂盒（纳磁生物，货号 NMGI211-100，鄂汉械备 20190365 号）、亚硫酸盐转化试剂盒（ZYMO Research EZ DNA Methylation-Lighting™ Kit（货号：D5030/5031））、无水乙醇、离心管、滤芯枪头、8 联管或 96 孔板、96 孔板封口膜及压膜器。

【储存条件及有效期】

1. 试剂盒在-20±5℃避光保存，有效期为 12 个月。
2. 试剂盒开瓶后，-20±5℃放置 1 个月不影响使用。
3. 试剂盒在使用时应尽量减少试剂冻融次数，并保证冻融次数不超过 6 次。
4. 试剂盒采用冷链（-20±5℃）运输，运输时间不超过 5 天。
5. 生产日期及有效期见标签。

【适用仪器】

1. 本试剂盒适用于 ABI 7500、SLAN-96S 实时荧光定量 PCR 仪。
2. 本试剂盒要求仪器使用 FAM 通道采集 SDC2 基因的扩增荧光信号，VIC 通道采集 ACTB 基因的扩增荧光信号。
3. 相关参数设置：
 - 1）荧光通道设置：FAM 通道，报告基团 FAM，淬灭基团 NFQ-MGB；VIC/HEX 通道，报告基团 VIC/HEX，淬灭基团 NFQ-MGB；参比染料：ROX。
 - 2）基线设置：在 SLAN-96S 荧光定量 PCR 仪上进行结果分析时，“扩增曲线算法”设置为“绝对荧光值法”。在 ABI 7500、SLAN-96S 荧光定量 PCR 仪上进行结果分析时，使用软件默认的自动基线，基线的设置范围可以根据具体扩增情况进行微调。
 - 3）阈值设定：所有机型均是根据样本扩增指数增长的拐点进行阈值划定，阈值的划定范围可以根据具体扩增情况进行微调。

【样本要求】

1. 粪便样本

- 1）样本采集：使用本试剂盒指定的粪便采集套装进行取样，取样量 0.8g~4g。
- 2）样本保存及运输：所采集样本建议立刻进行 DNA 的提取及亚硫酸氢盐的处理；否则建议将样本置于 2~8℃冰箱或-20±5℃冰箱保存，2~8℃条件下保存不超过一个月，-20±5℃条件下保存不超过三个月。样本应使用 2~8℃冷链运输。

2. 粪便 DNA 的提取

- 1）DNA 提取及质量要求：使用本试剂盒推荐的粪便 DNA 提取试剂盒进行提取操作。DNA 总用量要求不低于 40 ng。
- 2）DNA 保存：DNA 样本 2~8℃保存不超过 5 天，-20±5℃保存不超过六个月，冻融次数不超过 6 次。

3. 粪便 DNA 的转化

- 1）DNA 转化及质量要求：使用本试剂盒推荐的亚硫酸氢盐转化试剂盒进行转化操作。亚硫酸氢盐处理完的样本不适用于测定 OD260 来定量，不适用于通过 OD260/ OD280 来判定样本质量。
- 2）转化后 DNA 保存及运输：转化后的 DNA 样本建议立即检测，否则于-20±5℃保存，保存时间不超过 3 个月，冻融次数不超过 3 次。

【检验方法】

1.试剂准备：（试剂准备区）

- 1）从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温，各组分充分融解，快速离心 10 秒。
- 2）核算当次实验所需要的反应数（n），并根据表 2 中的反应体系配方计算当次实验所需相应的试剂量，配制 PCR 反应混合液：
$$n = \text{样本数} + \text{ZYMT-044 对照品 A (1T)} + \text{ZYMT-044 对照品 B (1T)} + \text{ZYMT-044 空白对照 (1T)}$$

表 2：PCR 反应混合液配制方法

试剂名称	单反应体系配方	n 个反应体系配方
SDC2 PCR 反应液	19.75μL	19.75×n μL
ZYMT-044 Taq 酶	0.25μL	0.25×n μL

- 3）按照 20μL/孔分装量将配好的 PCR 反应混合液分别分装到 n 个反应管内。

- 4）PCR 反应管转移至样本准备区，剩余试剂放回-20±5℃冷冻避光保存。

2.样本准备：（样本准备区）

- 1）样本 DNA 提取：按照磁珠法粪便和土壤基因组提取试剂盒（纳磁生物，货号 NMGI211-100，鄂汉械备 20190365 号）说明书进行操作。

粪便样本使用本试剂盒指定的粪便采集套装进行取样后，取液体粪便上清液进行核酸提取，样本 DNA 提取步骤如下：

- 取上清 200 μL，加入 450 μL 裂解液，5 μL 蛋白酶 K，70℃金属浴裂解 10 min。
- 裂解结束，12000 rpm 离心 2min，取 400 μL 上清液到新的 1.5 mL 或 2.0 mL 离心管中（尽量避免取到上层油状物）。
- 向离心管加入 150 μL 除杂剂，充分混匀，4℃冰浴 5 min。
- 取 500 μL 磁珠至 1.5 mL 或 2.0 mL 离心管中（注意：为了确保磁珠彻底重悬，请充分振荡混匀后立即吸取），置于磁力架上静置 1 min 后将全部上清吸出，磁珠保存待用。
- 冰浴结束后，将离心管 12000 rpm 离心 2 min，取 400 μL 上层清液，至磁珠保存待用的离心管中。
- 向离心管中加入 500 μL 结合液，振荡混匀 1 min，室温静置 10 min，每 3 min 混匀一次。
- 将离心管置于磁力架上，静置 1 min，期间颠倒磁力架 5~6 次，使管盖上的磁珠被磁力架吸附，用移液器吸去管盖和管中的液体。
- 取下离心管，加入 500 μL 洗涤液 I，将离心管充分振荡混匀 2 min 后，期间颠倒磁力架 5~6 次，使管盖上的磁珠被磁力架吸附，置于磁力架上，静置 30 s，磁珠完全吸附后，吸弃上清。
- 取下离心管，加入 500 μL 洗涤液 II，将离心管充分振荡混匀 2 min 后，期间颠倒磁力架 5~6 次，使管盖上的磁珠被磁力架吸附，置于磁力架上，静置 30 s，磁珠完全吸附后，吸弃上清。
- 重复一次上一步骤。
- 吸弃上清后，打开管盖，室温干燥 2 min 至乙醇充分挥发。
- 取下离心管，加入 60 μL 洗脱液，振荡混匀使磁珠完全浸没在洗脱液中，再置于 65℃孵育 10 min，期间混匀 2 次。
- 将离心管短离心，置于磁力架上，静置 30 s，待磁珠完全吸附，用移液器将液体转移至一新离心管中（切勿吸到磁珠），所得溶液即为提取的核酸样品。

- 2）样本 DNA 转化：按照 ZYMO Research EZ DNA Methylation-Lighting™ Kit（货号：D5030/5031）说明书进行操作，步骤如下：

- 配制如下转化体系：

组分	体积
Lighting Conversion Reagent	130 μL
待转化 DNA 样本	20 μL
Total	150 μL

注：如果 DNA 体积不足 20μL，用水补齐。

- 将配制好的转化体系放入 PCR 仪，按照如下程序进行孵育：
 - a）98℃，8min
 - b）54℃，60min

c) 4℃保存至多 20hours

- 将纯化柱套于收集管上，同时向纯化柱中加入 600μL 的 M-Binding Buffer。
- 将孵育完成的样本全部加入已加入 M-Binding Buffer 的纯化柱中。关闭管盖，颠倒混匀若干次。
- 全速离心 (>10000 x g) 30s。弃去收集管中的废液。
- 向纯化柱中加入 100μL 的 M-Wash Buffer。全速离心 30s。
- 向纯化柱中加入 200μL 的 L-Desulphonation Buffer，室温 (20-30℃) 孵育 15min。孵育结束后，全速离心 30s。弃去收集管中的废液。
- 向纯化柱中加入 200μL 的 M-Wash Buffer，全速离心 30s。重复本步骤一次。
- 将纯化柱从收集管中取出，套入一个新的洁净的 1.5mL 离心管，向纯化柱中加入 10-20 μL 的 M-Elution Buffer。静置 1min，全速离心 30s 洗脱得到转化后 DNA。

3) 加样:

a) 将亚硫酸氢盐转化后的待测样本 DNA、YZYMT-044 对照品 A、YZYMT-044 对照品 B 以及 ZYMT-044 空白对照，分别加入已装有 PCR 反应液的反应管中，加入量为 5μL/孔。**(注：YZYMT-044 对照品 A、YZYMT-044 对照品 B，需经过转化后方可进行后续 PCR 检测，YZYMT-044 空白对照无需处理，可直接点样)**

b) 盖好 PCR 反应管盖，记录样本加样情况，离心后将 PCR 反应管转移到核酸扩增区进行上机检测。若 PCR 反应管内加入模板后遇临时情况不能立即上机，建议将加好模板的 PCR 反应管放于 2~8℃条件暂时保存，并在 24 小时内尽快上机检测。

3. PCR 扩增：(核酸扩增区)

- 1) 开机，并进行仪器性能自检。
- 2) 取样本准备区准备好的 PCR 反应管，放置在仪器样品槽相应位置，并记录放置顺序。
- 3) 按表 3 设置仪器扩增相关参数，并开始进行 PCR 扩增。反应结束后，根据扩增曲线，划定合适基线（一般为自动基线）和荧光阈值（一般将阈值划定在扩增曲线对数形式下指数增长期的中间），得到相应通道的 Ct 值并按下述判读方式进行结果判定。

表 3：仪器扩增相关参数

体系	总体积为 25μL		
信号采集	SDC2 PCR 反应液	SDC2—FAM 通道采集荧光信号 ACTB—VIC 通道采集荧光信号	
PCR 反应条件	阶段	条件	循环数
	预变性	95℃：5 分钟（min）	1
	PCR	95℃：15 秒（s）	45
		58℃：30 秒（s） （设置在此阶段结束时采集荧光信号）	
		72℃：30 秒（s）	

【阳性判断值】

本试剂盒阳性判断值研究临床粪便样本，包括测试集和验证集两组，总共检测样本 417 例，包括不同分期的结直肠癌、进展期腺瘤、腺瘤息肉、胃炎、胃癌、食管炎、肝癌、其他消化道良恶性疾病等不同样本类型。使用百分位数法统计计算样本的内标参考值，绘制 ROC 曲线并计算约登指数，划定试剂盒靶点的阳性阈值。

阳性判断值分析结果显示：VIC 通道的 Ct 值≤36，FAM 通道 Ct 值≤38 时判断样本为阳性，FAM 通道 Ct 值>38 时判断样本为阴性；VIC 通道的 Ct 值>36 或者无 Ct 值时，判定样本不合格。

【检验结果的解释】

1. 空白对照无明显扩增曲线、无 Ct 值或 Ct 值>40，说明试验无污染，可继续分析检测结果；否则提示环境中可能存在 DNA 气溶胶污染，建议对环境消毒清洁或更换实验环境后重新实验。
2. SDC2 PCR 反应液检 ZYMT-044 对照品 A，FAM、VIC 通道 CT 值均≤32；SDC2 PCR 反应液检 ZYMT-044 对照品 B，FAM 通道 CT 值>38 或无 CT 值，VIC 通道 CT 值均≤32，说明实验体系正常，可继续分析检测结果。
3. 若 SDC2 PCR 反应液检样本 VIC 通道 Ct 值≤36，可继续分析；若 Ct 值>36，提示样本 DNA 含量不足或降解，样本不合格，需重新提取或转化样本 DNA。
4. 样本质量判定合格时，FAM 通道无明显扩增曲线或 CT 值>38 的样本为阴性；出现 S 型扩增曲线且 CT 值≤38 的样本为阳性。
5. 判定为阳性样本的患者，建议进行肠镜检查以确诊；判定为阴性的患者不排除患病的可能；判定为样本不合格的，建议患者重新取样进行检测。

【检验方法的局限性】

1. 样本检测结果与样本的收集、处理和保存过程有关，其中任何失误都将导致检测结果的不准确。如果样本处理时未控制好 DNA 的质量，可能出现假阴性的结果。粪便样本的收集与保存建议使用推荐的粪便采集套袋。
2. 本试剂盒检测结果仅供临床参考，不得作为临床诊治的唯一依据。对患者应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
3. 本试剂盒的检测系统仅适用于 ABI7500、SLAN-96S 实时荧光定量 PCR 仪；样本检测应严格按照说明书要求操作。
4. 当检测结果为阳性时，建议患者接受肠镜检查；检测结果为阴性时，不排除被检测者患病的可能。

【产品性能指标】

1. 试剂盒包装完整，无内容物溢出；标签外观完整，无脱落，标签标识内容清晰；试剂盒内组成正确，无重复、缺失组分情况。
2. 阴/阳性符合率
2.1 阴性符合率：检测 6 份 SDC2 阴性参考品，甲基化 SDC2 基因扩增结果应均为阴性；

2.2 阳性符合率：检测 7 份 SDC2 阳性参考品，甲基化 SDC2 基因扩增结果应均为阳性。

3. 检测限：本试剂盒最低可在 2ng/μl 人基因组 DNA 背景下检测出不低于 1%甲基化比率的 SDC2 基因甲基化。

4. 重复性：分别检测 SDC2 重复性参考品 R1、R2 各 10 次，结果满足甲基化 SDC2 基因扩增呈阳性，同时内参基因 ACTB 扩增曲线正常。计算甲基化 SDC2 基因的 Ct 值变异系数（CV）不高于 5%。

5. 分析特异性：

5.1 粪便样品中分别含有以下物质：动物 DNA（500ng/ml）、植物组织（500ng/ml）、植物油（10 μl/ml）、通便类药物甘露醇（75mg/ml）、通便灵胶囊（7.25mg/ml）、痔疮膏（24.75mg/ml）、吗丁啉（0.14mg/ml）、四环素（10.65mg/ml）、青霉素（2.56mg/ml）、布洛芬胶囊 75μg/ml、胃药斯达舒（6.84mg/ml）、噢美拉唑（2.82mg/ml）、头孢克肟（20.5mg/ml）、盐酸左氧氟沙星（0.15mg/ml）、西咪替丁（2mg/ml）、感冒灵胶囊（0.27mg/ml）、血红蛋白（60mg/mL）对检测结果无影响。

5.2 正常人粪便基因组 DNA、非人源 DNA、结直肠癌相关的甲基化基因 BMP3、NDRG4 和 Septin9 对本试剂盒检测无交叉干扰。

5.3 对 4 例食管癌、5 例胃癌、3 例肝癌患者粪便样本，3 例胰腺癌、2 例膀胱癌、4 例肺癌及 4 例类风湿性关节炎患者粪便样本的潜在干扰进行了交叉验证，结果显示胰腺癌、膀胱癌、肺癌及类风湿性关节炎患者粪便样本的甲基化 SDC2 基因扩增均为阴性。胃癌样本有 2 例的甲基化 SDC2 基因扩增为阳性，食管癌、肝癌样本各有 1 例的甲基化 SDC2 基因扩增为阳性，提示在胃癌、食管癌、肝癌样本中也可能存在部分 SDC2 基因甲基化情况。

6. 腹泻患者可正常采样，腹泻类型粪便不影响试剂盒检测。

7. 在国内三家有资质的临床试验机构完成 1380 例病例的临床试验。临床性能如下：

与对比检测方法 Sanger 测序法检测结果进行比较：本试剂盒阳性符合率为 100%，阴性符合率为 98.46%，总符合率为 98.91%；

与对比试剂检测结果进行比较：本试剂盒阳性符合率为 100%，阴性符合率为 100%，总符合率为 100%；

与临床参考标准进行比较：在结直肠癌病例中，本试剂盒检测灵敏度为 85.04%；在肠进展期腺瘤病例中，检测灵敏度为 53.99%；在高级别上皮内瘤变病例中，检测灵敏度为 59.65%；在阴性病例中检测特异度为 92.15%。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅供体外诊断使用。
2. 不要使用超过有效期的试剂，且不同批号试剂盒内组分不能混用。
3. 检测样本时应同时检测 ZYMT-044 对照品 A 和 ZYMT-044 对照品 B，对试剂盒的性能、仪器性能、实验环境及操作进行监测，确保样本检测结果准确可靠。
4. 实验过程中若出现标本或试剂污染工作台及移液器，及时用 10%次氯酸钠或 75%酒精处理。实验结束后立即清洁工作台，并定期对工作台及实验用品进行消毒处理。
5. 本试剂盒内对照品不具有传染性，但在使用时建议将其视为具有潜在传染性物质进行处理。
6. 本试剂盒内用剩的试剂及实验过程中的废弃物建议按照医疗废弃物进行处理。
7. 临床实验室应严格按照《医疗机构临床基因扩增实验室管理办法》（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】

符号	意义
IVD	体外诊断医疗器械

【参考文献】

1. 中国结直肠癌筛查与早诊早治指南.中国肿瘤杂志 2021,30(1).
2. Oh T J, Oh H I, Seo Y Y, et al. Feasibility of quantifying SDC2 methylation in stool DNA for early detection of colorectal cancer[J]. Clinical Epigenetics, 2017, 9(1):126.
3. Niu F, Wen J, Fu X, et al. Stool DNA Test of Methylated syndecan-2 for the Early Detection of Colorectal Neoplasia[J]. Cancer Epidemiology, Biomarkers &Prevention, 2017, 26 (9), 1411-1419.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：武汉友芝友医疗科技股份有限公司

住所：武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号武汉光谷国际生物医药企业加速器 1.2 期 23 栋 1 单元 4、5 层

联系方式：027-65330996

售后服务单位：武汉友芝友医疗科技股份有限公司

联系方式：027-65330996

生产地址：武汉市东湖新技术开发区高新大道 858 号生物医药园加速器一期 A4 栋西侧 1 楼、

武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号武汉光谷国际生物医药企业加速器 1.2 期 23 栋 1 单元 5 层

生产许可证编号：鄂食药监械生产许 20120580 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准 20253400796

【说明书核准日期及修改日期】

2025 年 4 月 21 日