

结直肠癌甲基化基因检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】
通用名称：结直肠癌甲基化基因检测试剂盒（PCR-荧光探针法）
英文名称：Diagnostic kit for methylated genes of colorectal cancer（Real Time PCR）
【包装规格】30 人份/盒
【预期用途】

本试剂盒用于体外检测人外周血血浆中结直肠癌甲基化基因 S9、H2、T2 基因的甲基化。
病人外周血中甲基化的 S9、H2、T2 基因可以通过 DNA 的特异扩增而被检测到^[1]。本试剂盒适用于临床医师建议做肠镜检查检测，但因病人依从性差或其它医学原因无法做肠镜检查检测患者的辅助诊断，不能作为肿瘤早期诊断或确诊的依据，不宜用于普通人群的肿瘤筛查，仅作为辅助诊断供临床医师参考。

我公司研究开发的基于外周血检查的 S9、H2、T2 基因甲基化检测试剂盒，使病人多了一种无创性结直肠癌辅助诊断方法的选择。

【检验原理】
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。将亚硫酸盐转化的 DNA（BisDNA）做多重 PCR 扩增，PCR 反应中的引物、探针能区分甲基化和非甲基化序列，甲基化序列优先得到扩增，与甲基化 S9、H2、T2 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。内参对照 ACTB（β-actin）基因用于评估检测中 DNA 量是否足够。

试剂组分	主要成分	体积/数量
1. PCR 反应液	Taq 酶、dNTP、Mg ²⁺	0.6mlx2
2. 引物混合液	引物、探针	0.24mlx1
3. 阴性质控品	人白细胞 DNA、BSA 和 TE	4.2mlx1
4. 阳性质控品	人白细胞 DNA、Hela DNA、BSA 和 TE	4.2mlx1

【储存条件及有效期】
1. 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。
2. PCR 试剂盒于-25~-15℃存储，避免反复冻融。在第一次用后，所有的试剂在-25~-15℃可存储 6 周。
3. 生产日期及有效期至详见具体的产品标签。

【适用仪器】
宏石 SLAN® PCR 分析系统、Applied Biosystems 7500、Roche Lightcycler 480。

【样本要求】
样品的收集和存储按以下执行：

- 1、全血采集
采血量：5ml。
采血方法：建议使用血浆游离 DNA 采血管采集。如果无法使用血浆游离 DNA 采血管，应采用 EDTA 抗凝管收集 5ml 静脉血。
采集后的血样应立即分离血浆。若不能立即分离血浆，应在 2~8℃保存，保存时间不超过 4 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将 2.0ml 血浆移入标记好的圆锥底的离心管中。
 - 血浆样本可以在-25~-15℃下保存不超过 4 周。血浆样本可以在 2~8℃存放不超过 12 小时。
- 3、血浆游离 DNA 提取及亚硫酸盐转化

- 按照核酸提取试剂盒说明书提取、亚硫酸盐转化 2ml 血浆（2ml 质控品）游离 DNA，获得 35μl 亚硫酸盐转化的 DNA（BisDNA）。每个样本测试 3 个 PCR 复孔，亚硫酸盐转化的 DNA（BisDNA）模板体积不能少于 32μl。

【检验方法】
警告：在检验操作前，应先阅读相关 PCR 分析系统的使用说明书，熟悉仪器的操作流程。

- 1、PCR 预反应液准备
 - 根据反应样本量，融化 PCR 反应液、引物混合液。涡旋混匀 PCR 反应液 10-15 秒，短暂离心。
 - 每个 PCR 反应需要 12.5μl PCR 反应液和 2.5μl 引物混合液。按比例将相应体积的 PCR 反应液和引物混合液加入到离心管中。涡旋混匀 PCR 预反应液，短暂离心，将管壁液滴离下来。
注意：PCR 反应液和引物混合液使用完毕立即复冻。
- 2、PCR 反应板准备
 - 将 15μl PCR 预反应液加至选定好的 96 孔 PCR 板的板孔中。加入 10μl 的 BisDNA 至 PCR 板对应的孔中。
 - 用胶膜密封，1000±100rcf 离心 1 分钟，使混合液全部流入管底并且无气泡出现。密封后的 PCR 板可在 2~8℃放置不超过 2 小时。
- 3、宏石 SLAN® PCR 仪上机

3.1、PCR 反应板加载
PCR 预反应液中不包含 ROX 或其它染料，S9 选取 FAM 荧光通道，H2 选取 JOE 荧光通道，T2 选取 Texas Red 荧光通道，ACTB 选取 Cy5 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	荧光信号收集	循环数
阶段 1	活化	98℃	5 分钟		1
阶段 2	PCR 循环	95℃	10 秒		45
		63℃	5 秒		
		58℃	30 秒	X	
阶段 3	降温	25℃	10 秒		1

注：X 代表荧光收集阶段

- 3.2、分析条件设置
分析运行结果，将基线的起始点设为第“10”个循环，终点设为第“18”个循环（可视具体状况进行基线起点和终点的微调），设置 S9、T2 阈值 0.03，H2 阈值 0.05，ACTB 阈值 0.05。
- 4、Applied Biosystems 7500 PCR 仪上机
- 4.1、PCR 反应板加载
PCR 预反应液中不包含 ROX 或其它染料，Passive Reference 设置必须为“none”，S9 选取 FAM 荧光通道，H2 选取 JOE 荧光通道，T2 选取 Texas Red 荧光通道，ACTB 选取 Cy5 通道，如表 1 所示设置反应程序。
- 4.2、分析条件设置
分析运行结果，将基线的起始点设为第“10”个循环，终点设为第“18”个循环（可视具体状况进行基线起点和终点的微调），设置 S9、H2 和 ACTB 阈值 6000，T2 阈值 8000。

- 5、Roche Lightcycler 480 PCR 仪上机
- 5.1、PCR 反应板加载
点击设置，双击 Detection Formats 添加荧光通道：S9（465-510nm）、H2（540-580nm）、T2（540-610nm）、ACTB（610-670nm），如表 1 所示设置反应程序。
- 5.2、分析条件设置
分析条件设置，选择“Abs Quant/Fit Points”分析运行结果，将基线的起始点设为第“9”个循环，终点设为第“17”个循环（可视具体情况进行基线起点和终点的微调）；Noiseband 设为 Auto 模式；设置 S9 阈值为 0.7、H2 阈值为 0.55，T2 阈值为 0.45，ACTB 阈值为 0.15。

6、P 值计算
将 PCR 数据文件以 txt、excel 格式输出，再将 PCR 数据文件导入到 P 值计算公式，计算输出 P 值及阴阳性。

7、待测样本 PCR 反应结果的解释
如果内参对照 ACTB 显示加入 DNA 的量足够的话（ACTB Ct≤35.0），那么 S9、H2、T2 的 PCR 结果视为本次 PCR 反应结果。如果 ACTB 的 Ct>35.0，那么定义该 PCR 反应为“无效”。

【参考区间】

使用结直肠癌甲基化基因检测试剂盒（PCR 荧光探针法）对临床研究样本进行 S9、H2、T2 基因检测，使用本试剂盒 P 值计算软件分析 Ct 值获得样本风险值（P 值），所有样本 P 值均在 0-10 之间。为了确定最佳临界点，再用统计学上的约登指数（真阳性率与假阳性率之差）来确定最合适的灵敏度和特异性所对应的 Cutoff 值。根据软件使用 ROC 法进行计算，Cutoff 值为 1.2 时准确性最优。

检测结果显示：全部临床研究样本的 ACTB 基因 Ct 值范围在 21.0-34.0。ACTB 基因的 Ct 平均值为 30.75，样本间变异 SD=1.41 个 Ct，故 ACTB 的参考范围为≤35.0。因此当样本 ACTB 的 Ct≤35.0 或阴、阳性质控品的 S9、H2 和 T2 与 ACTB 的 Ct 值结果均符合性能指标时，待测样本的判定标准：样本 P 值≥1.2，则判断样本为阳性；样本 P 值<1.2，则判断样本为阴性。

【检验结果的解释】

根据待测样本在 PCR 仪器上测定得到的 S9、H2、T2 和 ACTB 的 Ct 结果，按照软件计算检测结果判定待测样本的检测结果。

阳性结果：待测样本 ACTB 的 Ct 结果≤35.0，样本 P 值≥1.2 则判断样本为阳性。

阴性结果：待测样本 ACTB 的 Ct 结果≤35.0，样本 P 值<1.2 则判断样本为阴性。

无效结果：如果 ACTB 的 Ct 结果>35.0，说明本次结果无效。对于无效结果建议复查。

【检测方法的局限性】

- 1. 只能用于体外诊断。
- 2. 该产品的有效性仅针对对于 Streck 公司生产的 cell-free DNA BCT™采血管和 EDTA 抗凝采血管。对于其它血样的收集方式有效性没有做测试。
- 3. 该产品的使用者应该是接受过 PCR 反应训练的试验者。
- 4. 由于结直肠癌检测依赖于样品中肿瘤 DNA 的量、所以可能受样品收集过程、样品储存方式、病人个体因素（如年龄，其它疾病）以及肿瘤级别影响，外周血的采集、血浆的制备和存储均应按照要求进行，否则将影响检测结果，导致假阴性的检测结果。
- 5. 由于血浆样本中游离 DNA 含量低、易降解，应严格按照【样本要求】的规定处理和保存样本，否则影响检测，造成假阴性结果。
- 6. 由于扩增的初始靶 DNA 含量极低，故扩增循环数较长。应尽量避免检测环境的污染，否则容易在扩增循环末期产生假阳性信号。

【产品性能指标】

1. 产品的性能指标

1.1 物理检查

各管试剂外观完整，标记清楚，无破损。试剂融化后，溶液澄清透明，无沉淀，无悬浊物。说明书清楚完整，品名、批号和有效期清楚。

1.2 阳性符合率

检测 3 份阳性质控品，结果均应为 S9 和 T2 扩增曲线正常且平均 Ct≤41.0，H2 扩增曲线正常且平均 Ct≤42.0，同时内参 ACTB 扩增曲线正常且平均 Ct≤35.0，P 值≥1.2。

1.3 阴性符合率

检测 3 份阴性质控品，结果均为 S9 和 T2 无 Ct 或平均 Ct>41.0，H2 无 Ct 或平均 Ct>42.0，内参 ACTB 扩增曲线正常且平均 Ct≤35.0，P 值<1.2。

1.4 灵敏度

检测 3 份检测限质控品，S9 和 T2 扩增曲线正常且平均 Ct≤41.0，H2 扩增曲线正常且平均 Ct≤42.0，同时内参 ACTB 扩增曲线正常且平均 Ct≤35.0，P 值≥1.2。

1.5 精密度，

检测 1 份阳性质控品，10 次重复，结果全部为 S9 和 T2 扩增曲线正常且平均 Ct≤41.0，H2 扩增曲线正常且平均 Ct≤42.0，同时内参 ACTB 扩增曲线正常且平均 Ct≤35.0，计算所测得 S9、H2、T2 和 ACTB 的 Ct 值的变异系数（CV），均应不高于 10%。

1.6 稳定性

试剂盒置于-20℃±5℃保存至有效期满 12 个月以后，检测结果应符合 1.2-1.5 的各项指标要求。

备注：企业质控品的组成详见表 2。

表 2：企业质控品的组成

类型	组成

类型	组成
阳性质控品（4.2 毫升/管）	TE+ BSA + 人白细胞 DNA + HeLa 细胞 DNA
阴性质控品（4.2 毫升/管）	TE+ BSA + 人白细胞 DNA
检测限质控品（4.2 毫升/管）	TE+ BSA + 人白细胞 DNA + HeLa 细胞 DNA

2. 其它干扰

干扰实验显示，样本中含有以下干扰物：未甲基化 DNA（150ng/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，120mg/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。

【注意事项】

1. 实验室注意事项

- 1.1 所有试剂应用前需先 4℃解冻。
- 1.2 此项检测属分子诊断，检测场所应当满足卫生部临检中心对 PCR 临床实验室的要求。
- 1.3 在完成实验后，PCR 产物应当放入手套中，打结封口后丢弃，以免造成污染。

2. 微生物及感染状态

产物中不含有任何具有感染性的物质，不会感染人体或其它动物。待测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】

	使用期限		参考使用说明书
	运输温度低于 8℃		制造日期
	体外诊断医疗器械		批号
	怕晒		怕雨

【参考文献】

- 1. Catherine Lofton-Day, Fabian Model. et al, DNA-Methylation Biomarkers for Blood-Based Colorectal Cancer Screening, Clinical Chemistry 2008;54(2):414-423.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：北京艾克伦医疗科技有限公司

住所：北京市昌平区科技园区白浮泉路 10 号 2 号楼北控科技大厦 3 层 302 室

联系方式：

客服电话：010-89760098

邮编：102200

传真：010-89760098-8008

生产地址：北京市昌平区科技园区白浮泉路 10 号 2 号楼北控科技大厦 3 层 302 室、北京市昌平区超前路 37 号 1 幢 4 层 5-4-2-01

【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】