

SHOX2/RASSF1A/PTGER4 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：SHOX2/RASSF1A/PTGER4 基因甲基化检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【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 SHOX2、RASSF1A、PTGER4 基因的甲基化。

本产品用于临床上对疑似肺癌患者的辅助诊断，检测结果阳性不作为肺癌早期诊断或确诊的证据，检测结果阴性也不能排除肺癌的可能。该检测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。

SHOX2 属于 SHOX 基因家族，在胚胎形成期对骨骼、心脏和神经系统的发育作用重大，在肺癌、乳腺癌和肾癌中异常表达。RASSF1A 调控涉及基因转录、信号转导、细胞周期、细胞凋亡等多种生物学功能，可以通过多种途径抑制肿瘤形成。PTGER4 属于 G 蛋白偶联受体家族，是非常重要的抑癌基因。研究发现，肺癌患者血浆样本中 SHOX2、RASSF1A 及 PTGER4 三基因启动子区域呈高度甲基化。

【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 SHOX2、RASSF1A、PTGER4 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。

【主要组成成分】

试剂组分	主要成分	体积/数量
1.PCR 反应液	热启动 DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl ₂	0.6mlx2
2.引物混合液	引物、探针	0.24mlx1

3.阴性质控品	人类基因组 DNA、BSA 和 TE	4.2mlx1
4.阳性质控品	人类基因组 DNA、Hela 细胞基因组 DNA、BSA 和 TE	4.2mlx1

以下试剂和耗材是本试剂盒不包含，但对该实验必需的：

- 血浆游离 DNA 提取和亚硫酸盐转化试剂盒（使用试剂盒名称：核酸提取试剂；备案号：京昌械备 20180004 号；公司名称：北京艾克伦医疗科技有限公司）；
- 无水乙醇（分析纯，浓度高于 99.7%）；
- 15 mL 聚丙烯离心管带有圆锥型底，无菌；
- 1.5 mL 离心管；
- 移液器，包括 1ml、200 μ L，20 μ L 及 10 μ L 规格；
- 移液器适配的吸头；
- 一次性移液器，可以非无菌包装，长度 15cm，体干直径 5mm，能吸取 5 mL 液体；
- 磁力架；
- 恒温震荡金属浴；
- 8 联排 PCR 管及管盖；
- 采血管：含 EDTA 抗凝剂的真空采血管（BDVacutainer®，6mL，国械注进 20152222083），或游离 DNA 采血管（康为世纪，5mL，苏械注准 20192220059）。

【储存条件及有效期】

1. 试剂盒于-20 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C存储，有效期为 12 个月。
2. 请勿使用过期的试剂，不同批次的试剂盒不能混用。避免反复冻融。在第一次用后，所有的试剂在-20 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C可存储 6 周。生产日期及失效日期详见具体的产品标签。

【适用仪器】

宏石 PCR 分析系统 SLAN-96P、Applied Biosystems 7500，Roche Lightcycler 480。

【样本要求】

血样的收集和保存按以下执行：

1. 全血采集

采血量：5ml。

采血方法：采用 EDTA 抗凝管收集 5ml 静脉血（真空采血管，BDVacutainer®，6mL，国械注进 20152222083，或游离 DNA 采血管，康

为世纪，5mL，苏械注准 20192220059)。

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 采血管采集后的血浆可以室温保存 4 天。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 $1350 \pm 150\text{rcf}$ 。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 $1350 \pm 150\text{rcf}$ 。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 $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ 下保存不超过 30 天。血浆样本可以在 2~8℃存放不超过 12 小时。

3. 亚硫酸盐转化的 DNA (BisDNA) 样本保存

使用北京艾克伦医疗科技有限公司的核酸提取试剂（京昌械备 20180004 号），按照核酸提取试剂盒说明书提取、亚硫酸盐转化。若 BisDNA 不立即使用，可在 2~8℃保存 16 小时，或在 $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ 保存 4 天。

【检验方法】

1. 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 35 μl 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 32 μl 。

使用北京艾克伦医疗科技有限公司的核酸提取试剂（京昌械备 20180004 号），核酸提取及转化步骤如下：

● 试剂配制

洗液 A 使用前，须按瓶子标签所示，加入 40ml 无水乙醇进行稀释。

洗液 B 使用前，须按瓶子标签所示，加入 65ml 无水乙醇进行稀释。

核酸纯化磁珠初次使用时，必须剧烈摇晃 1~2 分钟让磁珠充分分散。

● 裂解

将 2.0ml 血浆样本分别转移到事先标记好的 15ml 离心管中，加入 3.0ml 裂解液 DL。盖紧离心管盖，涡旋混匀。把离心管置于轮状旋转混匀器上，室温中速（大约 10~20rpm）旋转 20 分钟。

● DNA 结合

将 100 μl 磁珠（新鲜悬浮）添加到 15ml 离心管中，盖紧离心管盖，颠倒混匀 5~6 次。把离心管置于轮状旋转混匀器上，室温中速（大约 10~20rpm）旋转 60 分钟。

● DNA 洗涤

将 15ml 离心管放置于磁力架上吸附 1~3 分钟。小心倒掉上清（注意不要倒掉磁珠，倒掉上清时保持 15ml 离心管放置于磁力架上）。若血浆样本中磁珠不能被磁力架有效分离，请将上述步骤的 15ml 离心管取下，加入 2.5ml 裂解吸附液颠倒混匀 5~6 次，重新放置在磁力架上进行磁珠分离。如仍不能有效分离磁珠，可将 15ml 离心管置于 55°C（50~60°C）水浴，10 分钟，放置磁力架上再次磁珠分离。

加入 1.0ml 洗液 A，涡旋混匀确保磁珠彻底重悬。用一次性移液管将磁珠悬浮液移至标记好的 1.5ml 离心管中。再次用移液管吸取残留磁珠悬浮液，将其转移至 1.5ml 离心管中。

将 1.5ml 离心管放置于磁力架上吸附 1 分钟，小心吸弃所有液体，注意不要吸取磁珠。

短暂离心 1.5ml 离心管。放置 1.5ml 离心管在磁力架上重新吸附 1 分钟，用 10~100 μ l 移液器尽量除去残余液体。

将离心管放置室温晾干 10 分钟

● 亚硫酸盐转化

一次向晾干的磁珠中加入 180 μ l 亚硫酸盐溶液，20 μ l 保护液，重悬磁珠。

将重悬磁珠转移到 PCR 管，将管置于 PCR 仪中，85°C 恒温孵育 45 分钟，也可以使用其他恒温加热仪器，不要振荡。45 分钟后，立即将离心管取出。

● 结合

将上述含有磁珠的反应液转移到 1.5ml 离心管。在离心管中加入：800 μ l 裂解液 DL。涡旋混匀。

将离心管置于轮状旋转混匀器中，调整转速为 10~20rpm，孵育 30 分钟。

短暂离心，将离心管置于磁力架 1 分钟，小心吸弃所有液体。

● 第一次洗涤

将离心管从磁力架上取下，加入 1000 μ l 洗液 A。涡旋混匀重悬磁珠，短暂离心。将离心管置于磁力架 1 分钟，小心吸弃所有液体。

● 第二次洗涤

将离心管从磁力架上取下，加入 1000 μ l 洗液 B，涡旋混匀重悬磁珠，短暂离心，将含有磁珠的洗液转移到新的离心管中。将离心管置于磁力架 1 分钟，小心吸弃所有液体。

● 第三次洗涤

将离心管从磁力架上取下，加入 1000 μ l 洗液 B，涡旋混匀重悬磁珠，短暂离心离心管。将离心管置于磁力架 1 分钟，小心吸弃所有液体。短暂离心，将离心管置于磁力架 1 分钟，用 10~100 μ l 移液器尽量除去残

余液体。

- 晾干

打开离心管管盖，室温静置 10 分钟待乙醇挥发，不要震荡。

- 洗脱

将离心管移至无磁力架子上，加入 30~100 μ l 洗脱液。盖好离心管，涡旋混匀重悬磁珠。将离心管放入恒温振荡器中，室温，100 $\pm$ 10rpm 震荡 10 分钟。短暂离心，将离心管置于磁力架 1 分钟。用 10~100 μ l 移液器将洗脱液转移新的离心管中。

2. PCR 检测

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。

2.1 PCR 预反应液的准备

- 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 12.5 μ l PCR 反应液和 2.5 μ l 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。

2.2 PCR 反应板准备

- 将 15 μ l PCR 预反应液加至选定好的 8 联排 PCR 管的管孔中。加入 10 μ l 的 BisDNA 至 PCR 管对应的孔中。
- 用管盖密封，1000 $\pm$ 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 管可在 2~8 $^{\circ}$ C 放置不超过 2 小时。

2.3 宏石 PCR 分析系统 SLAN-96P 上机

1) PCR 反应板加载

PCR 预反应液中不包含 ROX 或其它染料，SHOX2 选取 FAM 荧光通道，RASSF1A 选取 JOE 荧光通道，PTGER4 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 $^{\circ}$ C	5 分钟		1
阶段 2	PCR 循环	95 $^{\circ}$ C	10 秒		45
		63 $^{\circ}$ C	5 秒		
		58 $^{\circ}$ C	30 秒	X	
阶段 3	降温	25 $^{\circ}$ C	10 秒		1

注：X 代表荧光收集阶段

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，SHOX2、PTGER4 阈值 0.05，RASSF1A 阈值 0.03，ACTB 阈值 0.05（可视具体状况进行微调）。

2.4 Applied Biosystems 7500 PCR 仪上机

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”，SHOX2 选取 FAM 荧光通道，RASSF1A 选取 JOE 荧光通道，PTGER4 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。

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，设置 SHOX2、PTGER4 阈值 15000，RASSF1A 阈值 2000，ACTB 阈值 7000（可视具体状况进行微调）。

2.5 Roche Lightcycler 480 PCR 仪上机

1) PCR 反应板加载

点击设置，双击 Detection Formats 添加荧光通道：SHOX2（465-510nm）、RASSF1A（540-580nm）、PTGER4（540-610nm）、ACTB（610-670nm），如表 1 所示设置反应程序。

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；Noiseband 设为 Auto 模式；设置 SHOX2、RASSF1A 阈值为 0.9，PTGER4 阈值为 0.65，ACTB 阈值为 0.15（可视具体情况进行微调）。

2.6 P 值计算

将 PCR 数据文件以 txt 或 excel 格式输出，计算每个基因 3 个复孔平均 Ct 值导入到 P 值计算公式，计算 P 值及判断阴阳性。

【阳性判断值】

使用 SHOX2/RASSF1A/PTGER4 基因甲基化检测试剂盒（PCR-荧光探针法）对临床研究样本进行 SHOX2、RASSF1A、PTGER4 基因检测，使用本试剂盒 P 值计算公式分析 Ct 值获得样本风险值（P 值），所有样本 P 值均在 0 及以上。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，使用 ROC 法进行计算，Cutoff 值为 2.0 时准确性最优。

检测结果显示：全部临床前研究样本的 ACTB 基因 Ct 值范围在 26.04~36.02，取 95%的分位值，ACTB 的 Ct 值参考范围为≤35.0。

【检验结果的解释】

1. 质控品性能指标:

阴性质控品: 1 份阴性质控品, 进行 3 次 PCR 平行测试, SHOX2 的 3 次 PCR 反应无 Ct 或平均 Ct > 43.0, RASSF1A 的 3 次 PCR 反应无 Ct 或平均 Ct > 43.0, PTGER4 的 3 次 PCR 反应无 Ct 或平均 Ct > 43.0, 内参 ACTB 扩增曲线正常且平均 Ct ≤ 35.0, P 值 < 2.0。

阳性质控品: 1 份阳性质控品, 进行 3 次 PCR 平行测试, 结果为 SHOX2 的平均 Ct ≤ 35.0, RASSF1A 的平均 Ct ≤ 35.0, PTGER4 的平均 Ct ≤ 35.0, 同时内参 ACTB 扩增曲线正常且平均 Ct ≤ 35.0, P 值 ≥ 2.0。

2. 检验结果判读:

对每个样本进行 3 次 PCR 平行测试, 计算 SHOX2、RASSF1A、PTGER4 和 ACTB 基因 3 个复孔平均 Ct 值, 其中各个基因无扩增时, Ct 值定义为 45.0。

若质控品不满足性能指标, 则试验失败, 本次结果无效。

在质控品满足性能指标时, 根据样本的检测结果判断阴阳性:

阳性结果: 待测样本 ACTB 的平均 Ct 值 ≤ 35.0, 样本 P 值 ≥ 2.0 则判断样本为阳性。

阴性结果: 待测样本 ACTB 的平均 Ct 值 ≤ 35.0, 样本 P 值 < 2.0 则判断样本为阴性。

无效结果: 如果 ACTB 的平均 Ct 值 > 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于 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. 由于肺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 外观

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 份阳性参考品 (P1、P2、P3)，每份参考品进行 3 次 PCR 平行测试，结果为 SHOX2 的平均 $Ct \leq 41.0$ ，RASSF1A 的平均 $Ct \leq 41.0$ ，PTGER4 的平均 $Ct \leq 41.0$ ，同时内参 ACTB 扩增曲线正常且平均 $Ct \leq 35.0$ ，P 值 ≥ 2.0 。

在三种适用机型上使用三个不同批次的试剂盒对阳性样本池进行检测，阳性符合率为 100%。

1.3 阴性符合率

检测 3 份阴性参考品 (N1、N2、N3)，每份参考品进行 3 次 PCR 平行测试，结果为 SHOX2 的 3 次 PCR 反应无 Ct 或平均 $Ct > 41.0$ ，RASSF1A 的 3 次 PCR 反应无 Ct 或平均 $Ct > 41.0$ ，PTGER4 的 3 次 PCR 反应无 Ct 或平均 $Ct > 41.0$ ，内参 ACTB 扩增曲线正常且平均 $Ct \leq 35.0$ ，P 值 < 2.0 。

在三种适用机型上使用三个不同批次的试剂盒对阴性样本池进行检测，阴性符合率均为 100%。

1.4 灵敏度

检测 3 份检测限参考品 (L)，每份参考品进行 3 次 PCR 平行测试，结果为 SHOX2 的平均 $Ct < 45.0$ ，RASSF1A 的平均 $Ct < 45.0$ ，PTGER4 的平均 $Ct < 45.0$ ，同时内参 ACTB 扩增曲线正常且平均 $Ct \leq 35.0$ ，P 值 ≥ 2.0 。

本试剂盒可检测血浆中阳性 DNA 最低浓度为 $0.1\text{pg}/\mu\text{L}$ 。血浆中游离 DNA 浓度为 $0.02\text{ng}/\mu\text{L}$ 时，本试剂盒最低可检出 0.5% 的目标基因甲基化。

1.5 精密度

检测精密度参考品 (J1、J2)，每种参考品进行重复 10 次测试，结果为 P 值 ≥ 2.0 ，同时内参 ACTB 扩增曲线正常且 $Ct \leq 35.0$ ，计算所测得 SHOX2、RASSF1A、PTGER4 和 ACTB 的 Ct 值的变异系数 (CV)，均不应高于 10%。

使用三个不同批次的试剂盒，在三种适用机型上检验血浆样本，SHOX2、RASSF1A、PTGER4 和 ACTB 基因 Ct 值的变异系数均不应高于 10%。

1.6 稳定性

试剂盒置于 $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存至有效期满 12 个月以后，检测结果应符合 1.1-1.5 的各项指标要求。

2. 其它干扰

2.1 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。

2.2 常见治疗药物, 包括感冒药、消炎药、心脑血管疾病药、糖尿病药、胃病药、维生素、高血压药、安定药、镇痛药等在最大使用剂量范围内, 对检测结果无影响。

3. 交叉反应

本试剂盒检测干扰样本的综合特异性超过 85%。对于发生肺转移的其它原发癌症(包括肝癌、胃癌、胰腺癌、乳腺癌、食管癌、结直肠癌)检出率较低, 假阳性率低于 25%, 说明产品仅适用于原发性肺癌的检测。检测自身免疫性疾病包括红斑狼疮和类风湿性关节炎的特异性超过 90%, 假阳性率低于 10%。检测其它肺部疾病的特异性超过 85%, 假阳性率低于 15%。检测宫颈癌特异性为 80%, 假阳性率为 20%。

4. 临床试验结果

在 3 家临床检测机构进行临床试验, 共纳入 1303 例病例, 试验体外诊断试剂与临床参考标准相比, 灵敏性为 86.83%; 特异性为 95.59%, 总符合率为 92.33%。

【注意事项】

1. 实验室注意事项

- 1.1 所有试剂应用前需先 2~8℃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】

	运输温度低于 8℃		参考使用说明书
	体外诊断医疗器械		试剂盒含量足够测试份数
	向上		易碎
	怕晒		怕雨

CONTROL -	阴性对照	CONTROL +	阳性对照
-----------	------	-----------	------

【参考文献】

1. Bernd Schmidt, Volker Liebenberg, et al. SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer based on bronchial aspirates. BMC Cancer. 2010;10:600.
2. Christoph Kneip, Bernd Schmidt, et al. SHOX2 DNA Methylation Is a Biomarker for the Diagnosis of Lung Cancer in Plasma. Journal of Thoracic Oncology, 2011; 6(10):1632-8.
3. Hong Chen Makoto Suzuki, et al. Aberrant methylation of RASGRF2 and RASSF1A in human non-small cell lung cancer. Oncology Reports, 2006;15(5):1281-5.
4. Gunter Weiss, Anne Schlegel, et al. Validation of the SHOX2/PTGER4 DNA Methylation Marker Panel for Plasma-Based Discrimination between Patients with Malignant and Nonmalignant Lung Disease. Journal of Thoracic Oncology, 2017;12(1):77-84.
5. Minpu Ren, Chunhua Wang, et al. Methylation analysis of SHOX2 and RASSF1A in bronchoalveolar lavage fluid for early lung cancer diagnosis. Annals of Diagnostic Pathology, 2017;27:57-61.

【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：

售后服务单位名称：

联系方式：

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

医疗器械生产许可证编号：

【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】

核准日期：

修改日期：

说明书编号及版本号：