

人类 MGMT 基因甲基化检测试剂盒(荧光 PCR 法)说明书

【产品名称】

人类 MGMT 基因甲基化检测试剂盒(荧光 PCR 法)

【包装规格】

24 测试/盒

【预期用途】

试剂盒用于定性检测手术切除的胶质瘤石蜡切片样本中 MGMT (O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶) 基因的甲基化状态。

本试剂盒采用荧光 PCR 法分析 MGMT 基因启动子区 CpG 岛上 7 个 CpG 位点 (CGCTTTGCGTCCCGACGCCCGCAGGTCTCGCG) 的甲基化情况, 供临床医生筛选出 MGMT 基因发生甲基化的胶质瘤患者, 该人群对替莫唑胺 (TMZ) 治疗敏感。检测结果可用于高级别胶质瘤患者临床用药指导。

替莫唑胺作为新一代烷化剂, 是目前临床胶质瘤化疗的一线药物。其作用机制是通过烷化作用使 DNA 在鸟嘌呤 O⁶ 位置发生致命交联, 阻碍 DNA 复制而导致细胞凋亡。MGMT 基因编码产物是人体内一种重要的 DNA 修复酶。如果肿瘤组织中 MGMT 基因未发生甲基化, 基因正常表达, 可以将鸟嘌呤 O⁶ 位置上的烷化修饰基团移除, 修复 DNA 损伤, 导致烷化剂药物无效。当 MGMT 基因发生甲基化时, 基因转录停止, 鸟嘌呤 O⁶ 位置上的烷基基团转移失败, 不能有效修复 DNA 烷化损伤, 临床使用烷化剂药物有效。因此, MGMT 基因的甲基化可以作为胶质瘤患者对替莫唑胺化疗敏感及预后好的预测指标^[1,2]。

【检验原理】

试剂盒采用重亚硫酸盐处理肿瘤组织的 DNA 样本, 使没有发生甲基化的 C 碱基转变为 U, 而发生甲基化的 C 碱基保持不变; 经过特异性引物对 MGMT 基因目标片段进行 PCR 扩增后, U 碱基转变为 T, C 碱基转变为 C; 从而将甲基化和非甲基化的差异转变成为 C/T 碱基的差异。在 PCR 体系中加入甲基化特异性荧光探针, 通过监测荧光信号的变化来确定探针结合区段内 7 个 CpG 位点是否发生了甲基化。

【主要组成成分】

1. 主要组成成分及标示量

试剂盒 I (重亚硫酸盐转化试剂)

试剂名称	主要组分	标示量
重亚硫酸盐	重亚硫酸钠	3 管
转化液 A	氢氧化钠	5 mL
转化液 B	抗氧化剂、pH 指示剂	300 μL
MB 结合缓冲液	TRIS 缓冲液、胍盐	10 mL
洗涤液	TRIS 缓冲液、氯化钠	6 mL
脱硫液	氢氧化钠	3 mL
DNA 洗脱液	TRIS 缓冲液	5 mL
纯化柱	硅胶膜	24 个
收集管	/	48 个

试剂盒 II (荧光 PCR 扩增试剂)

试剂名称	主要组分	标示量
MGMT 扩增反应液*	引物、探针、dNTP、PCR 缓冲液	750 μL
外控扩增反应液*	引物、探针、dNTP、PCR 缓冲液	750 μL
Taq DNA 聚合酶	Taq DNA 聚合酶	15 μL
阴性对照	MGMT 非甲基化 DNA	100 μL
阳性对照	MGMT 甲基化 DNA	100 μL
空白对照	无核酸酶水	50 μL
Carrier RNA	核糖核酸	30 μL

* MGMT 扩增反应液中包含 MGMT 扩增体系 (FAM) 和内控扩增体系 (JOE)。

* 外控扩增反应液中仅包含 FAM 荧光扩增体系。

2. 不同批号试剂盒中各组分不得互换使用。

3. 阴性对照和阳性对照 DNA 来源于细胞系 DNA。

【储存条件及有效期】

储存条件: 试剂盒 I 室温保存, 有效期 12 个月; 试剂盒 II 储存于 -15℃ 或以下温度, 有效期 12 个月。

开封稳定性: 试剂盒在有效期内, 开封(冻融次数)要求不超过 3 次。

生产日期及有效期见试剂盒标签

【适用仪器】

ABI StepOne Plus、ABI 7500、LightCycler 480。

【样本要求】

由于肿瘤组织样本的复杂性, 石蜡切片样本中通常都会混杂一些正常组织细胞。这些正常细胞的 DNA 会对肿瘤细胞中发生甲基化的 DNA 产生“稀释”作用。另外, 经过甲醛固定和石蜡包埋的肿瘤切片样本中, DNA 都存在一定程度的降解, 也会对 MGMT 甲基化扩增的 Ct 值产生影响。请按下面的要求制备肿瘤组织石蜡切片, 提取 DNA 用于 MGMT 基因甲基化检测。

- (1) 用于甲基化检测的标本, 需要由经验丰富的病理医师筛选。肿瘤组织标本采用中性甲醛固定, 严格按照《临床技术操作规范 病理学分册》进行石蜡包埋。
- (2) 石蜡组织中至少含有 10% 以上的肿瘤细胞。在条件允许的情况下, 尽可能取肿瘤细胞含量高的组织、切片用于检测。
- (3) 每例样本切取 5~10 μm 的切片 8 张用于后续的 DNA 提取。
- (4) 推荐采用商品化的试剂盒提取切片样本的基因组 DNA。可以使用 QIAGEN 公司的 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (货号: 56404), 或者基因科技 (上海) 股份有限公司的核酸提取或纯化试剂 (货号: 566-050)。DNA 提取步骤严格按照试剂盒说明书的要求进行操作。
- (5) 提取的 DNA 需要采用紫外分光光度计进行质检。样本 DNA 合格的要求为: 10 ng/μL ≤ 浓度 ≤ 100 ng/μL, 1.6 ≤ A260/280 ≤ 2.1。符合要求的样本可直接用于重亚硫酸盐转化, DNA 浓度过高的样本需稀释后再使用, 浓度低于 10 ng/μL 的样本和 A260/280 比值超出正常范围的样本需重新提取 DNA。

【检验方法】

1. 实验准备

- (1) 首次使用前向洗涤液中加入 24 mL 无水乙醇(总体积 30 mL), 混匀后室温密闭保存。
- (2) 首次使用前向脱硫液中加入 27 mL 无水乙醇(总体积 30 mL), 混匀后室温密闭保存。

2. 重亚硫酸盐转化

- (1) 取 30 μL 待测样本 DNA (300 ng~3 μg) 至 PCR 反应管中。同时取阴性对照 (非甲基化 DNA) 和阳性对照 (甲基化 DNA) 各 30 μL 至相应的对照管中, 与待测样本同步处理。
- (2) 按样本数量取相应管数的重亚硫酸盐 (8 样本/管), 向每管中加入 0.65 mL 转化液 A, 充分振荡至完全溶解 (重亚硫酸盐溶液尽量现配现用, 剩余的溶液可 -20℃ 冻存, 避免反复冻融)。
- (3) 向样品及对照管中分别加入 60 μL 重亚硫酸盐溶液。
- (4) 向样品及对照管中分别加入 10 μL 转化液 B。
- (5) 盖紧管盖后, 振荡混匀反应液 (注意: 此时溶液应该变成蓝色), 短时离心将反应液收集至管底。
- (6) 将反应管置于 PCR 仪中, 95℃ 温浴 5 分钟, 60℃ 温浴 1 小时, 重复 5 个循环 (总反应时间约为 5.5 小时), 反应结束后 20℃ 温浴保存。

3. 转化产物的纯化

- (1) 取出反应管, 将 100 μL 转化产物转移至 1.5 mL 离心管中。
- (2) 加入 330 μL MB 结合缓冲液和 1 μL Carrier RNA (二者可先配成预混液后一起加入离心管), 振荡混匀。
- (3) 向离心管中加入 270 μL 无水乙醇, 振荡混匀。
- (4) 取出相应数量的纯化柱, 装入配套的收集管中。
- (5) 将离心管中的溶液全部转入纯化柱中, 8000 rpm 离心 1min, 弃废液。
- (6) 加 500 μL 洗涤液 (第 1 次) 至纯化柱中, 8000 rpm 离心 1min, 弃废液。
- (7) 加 500 μL 脱硫液至纯化柱中, 室温放置 15 min 后, 8000 rpm 离心 1min, 弃废液。
- (8) 加 500 μL 洗涤液 (第 2 次) 至纯化柱中, 8000 rpm 离心 1min, 弃废液。
- (9) 将纯化柱转入新的收集管中, 13000 rpm 离心 1min, 去除残留溶液。
- (10) 将纯化柱转入新的 1.5 mL 离心管中, 加 30 μL DNA 洗脱液至滤膜的中央, 室温放置 3min。
- (11) 8000 rpm 离心 1min, 所得溶液用于后续 PCR 扩增, 或贮存于 -20℃ 备用。

4. PCR 扩增

配制: 按下表配制 PCR 反应液:

试剂组分	混合液-1	混合液-2
MGMT 扩增反应液	27× (N+1) μL	/
外控扩增反应液	/	27× (N+1) μL
Taq DNA 聚合酶	0.25× (N+1) μL	0.25× (N+1) μL
总体积	27.25× (N+1) μL	27.25× (N+1) μL

注：N 为总的样本数，包含待测样本、1 个阴性对照、1 个阳性对照和 1 个空白对照。

分装：在 PCR 反应管中分装配制好的混合液，每个样本分装混合液-1 和混合液-2 各一管，每个反应管中分装 27 μL。

加样：在相应的反应管中分别添加 3 μL 重亚硫酸盐转化产物（包括待测样本、阴性对照、阳性对照和空白对照），PCR 反应总体积为 30 μL。

扩增：将 PCR 反应管放入荧光 PCR 仪中，运行如下扩增程序：

第一阶段：95℃温浴 3 分钟；

第二阶段：95℃温浴 15 秒，60℃温浴 60 秒，45 个循环；

信号收集：第二阶段 60℃时收集荧光信号。

MGMT 扩增反应管中收集 FAM 和 JOE/VIC 荧光信号。

外控扩增反应管中收集 FAM 荧光信号。

5. 结果分析

采用荧光 PCR 仪器配套的软件进行结果分析，将阈值线选定在超过空白对照/阴性对照扩增曲线的上方。用户可以根据仪器本身及 PCR 扩增的实际情况对阈值线进行调整，得到各扩增曲线对应的 Ct 值。

实验有效条件：

- (1) 空白对照反应管中的 FAM 和 JOE/VIC 信号应无曲线抬升。
- (2) 阴性对照的 MGMT 扩增反应管中 FAM 信号应无抬升，JOE/VIC 信号应抬升(Ct≤32)。
- (3) 阳性对照的 MGMT 扩增反应管中 FAM 信号应抬升(Ct≤32)。

【阳性判断值】

ΔCt 值的确定：首先确定样本 MGMT 甲基化扩增的 Ct 值(FAM 信号)，然后确定该样本的外控 Ct 值(FAM 信号)；ΔCt=Ct 甲基化-Ct 外控。根据 ΔCt 值的大小，结合内控和外控的扩增情况，判定样本中 MGMT 基因的甲基化状态：

- (1) 当样本 MGMT 反应管中无 FAM 信号抬升，且内控和外控扩增 Ct≤32 时，报告为 MGMT 甲基化阴性。
- (2) 当 ΔCt 值≤7 时，样本中 MGMT 基因甲基化含量≥1%，报告 MGMT 甲基化阳性。
- (3) 当 ΔCt 值>7 时，样本中 MGMT 基因甲基化含量<1%，报告低于试剂盒检测下限。

【检验结果的解释】

- (1) 如果空白对照管中 FAM 或 JOE/VIC 信号抬升，表明检测体系存在污染，实验结果无效，需重新检测。
- (2) 对于待测样本，外控反应管的 FAM 信号应该升起，一般情况下其 Ct 值应小于 32。
- (3) 如果外控 Ct 值>32，说明扩增体系中 DNA 模板量太少，建议增加起始 DNA 用量后重新进行检测。但 MGMT 反应管中 FAM 信号有抬升且 ΔCt 值落在阳性区，其结果仍然可信。
- (4) 待测样本的 MGMT 反应管中无 FAM 信号抬升时，需要检查内控的扩增情况。若内控信号抬升，说明 PCR 体系正常，可报告为 MGMT 甲基化阴性；若内控信号无抬升，说明 PCR 扩增受到抑制，需要重新检测。

【检验方法的局限性】

试剂盒扩增的目标片段位于 MGMT 基因启动子区 CpG 岛上，长度约 100 bp。甲基化荧光探针可以特异性鉴别扩增区段内 7 个 CpG 位点的甲基化状态。对于其它位置发生的甲基化，本试剂盒不能检出。

试剂盒的检测原理基于甲基化探针与 DNA 模板的特异性结合，荧光探针涵盖了 7 个 CpG 位点，当这些 CpG 位点完全甲基化时，探针可以与模板高效结合；如果 DNA 模板上只有小部分的 CpG 位点发生甲基化，可能会降低荧光探针的结合效率，导致 ΔCt 值偏大，判定为甲基化阴性。

样本稳定性研究结果显示，胶质瘤石蜡组织在室温条件下保存 3 年以内，甲基化检测结果保持稳定。保存年限超过 3 年的石蜡组织样本，可能因为 DNA 的过度降解而无法检出。

试剂盒对样本甲基化含量的检测下限为 1%，这是基于肿瘤细胞 DNA 模拟样本的测试结果。肿瘤样本因为成分复杂，且肿瘤细胞本身存在异质性，不能保证临床样本在只含有 1%肿瘤细胞时检测结果的准确性。建议石蜡组织中肿瘤细胞含量不低于 10%，且在条件允许的情况下，尽可能挑选肿瘤细胞含量高的组织用于检测。

【产品性能指标】

- (1) 准确度：检测 6 份 MGMT 甲基化阳性质控品，结果均为甲基化阳性，阳性符合率为 100%。

- (2) 特异性：检测 6 份 MGMT 甲基化阴性质控品，结果均为甲基化阴性，阴性符合率为 100%。
- (3) 精密度：对 1 份精密质控品进行 10 次重复检测，Ct 值的变异系数 (CV) ≤5%。
- (4) 检测限：对 MGMT 甲基化含量为 1%的质控品进行 20 次重复检测，阳性结果不少于 18 次。

临床试验：在多家机构开展的临床试验中，共测试胶质瘤样本 1011 例，非瘤脑组织样本 30 例。在胶质瘤样本中，MGMT 基因甲基化阳性率为 44.9%；与焦磷酸测序/BSP 克隆测序结果对比，阴性符合率为 98.2%，阳性符合率为 98.7%。在非瘤脑组织样本中，未检出甲基化阳性病例，与测序结果一致。

对 43 例 IV 级胶质瘤替莫唑胺治疗的随访结果显示：一年生存率 MGMT 甲基化阳性组明显高于阴性组 (78.3%对 40.0%)，中位生存时间 MGMT 阳性组明显长于阴性组 (23 个月对 10 个月)，差异有统计学意义 (P=0.041)；MGMT 基因甲基化阳性组与 MGMT 阴性组相比，其死亡风险 HR 为 0.49 (95%CI: 0.24~0.99)。

对 24 例 III 级胶质瘤替莫唑胺治疗的随访结果显示：一年生存率 MGMT 甲基化阳性组明显高于阴性组 (77.0%对 52.6%)，差异有统计学意义 (P=0.007)；MGMT 基因甲基化阳性组与 MGMT 阴性组相比，其死亡风险 HR 为 0.14 (95%CI: 0.04~0.58)。

汇总 III 级和 IV 级患者的随访数据，在 67 例高级别胶质瘤患者人群中，MGMT 基因甲基化阳性组的 1 年生存率明显长于 MGMT 甲基化阴性组 (84.2%对 58.6%)，差异有统计学意义 (P=0.001)；MGMT 基因甲基化阳性组与 MGMT 阴性组相比，其死亡风险 HR 为 0.34 (95%CI: 0.18~0.64)。研究结果表明 MGMT 甲基化阳性的高级别胶质瘤患者对于替莫唑胺治疗更敏感。

【注意事项】

- (1) 本试剂盒仅用于体外诊断。
- (2) 应由具有专业经验或经过专业培训的实验技术人员进行操作。
- (3) 开始实验前，使用者应仔细阅读试剂盒说明书。实验过程中，严格按照说明书要求的步骤进行操作。
- (4) 试剂盒应在合格的 PCR 实验室使用，依据卫生部颁布的基因扩增检验实验室的管理规范执行。
- (5) 实验操作的各个阶段应在不同的实验室或相对隔离的不同区域内进行。一般分为试剂准备区、样品处理区和 PCR 扩增区。
- (6) 不同的分区应使用专用的仪器和设备，不得交叉使用，以防止污染。
- (7) 实验中需使用一次性离心管、吸头，且要求无菌、无 DNase 污染。
- (8) 实验人员要求配戴一次性手套和口罩，避免试剂和皮肤接触。万一试剂与皮肤或粘膜接触，请立即用清水冲洗。
- (9) 试剂盒使用过程中产生的废弃物，以及用完后的剩余试剂要求按医疗废弃物统一销毁处理。
- (10) 请在试剂盒有效期内使用。

【参考文献】

- [1] 中国中枢神经系统胶质瘤诊断和治疗指南(2012). 中华医学杂志, 2012, 92(33): 2309-2313.
- [2] 中国脑胶质瘤分子诊疗指南(2014). 中华神经外科杂志, 2014, 30(5): 435-444.
- [3] YY/T 1182-2010, 核酸扩增检测用试剂(盒).
- [4] Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. N Engl J Med. 2005, 352(10): 997-1003.
- [5] van Niftrik KA, van den Berg J, van der Meide WF, et al. Absence of the MGMT protein as well as methylation of the MGMT promoter predict the sensitivity for temozolomide. Br J Cancer. 2010, 103(1): 29-35.
- [6] Reifenberger G, Hentschel B, Felsberg J, et al. Predictive impact of MGMT promoter methylation in glioblastoma of the elderly. Int J Cancer. 2012, 131(6): 1342-1350.

【基本信息】

注册人/生产企业：基因科技(上海)股份有限公司

住所：上海市闵行区紫月路 505 号 邮编：200241

电话：021-67285000 传真：021-67285900

网址：www.genetech.com.cn

售后服务单位：基因科技(上海)股份有限公司

生产地址：上海市闵行区紫竹高新技术产业开发区紫月路 505 号 1 号楼 A 区 2-4 层、B 区 2 层

【医疗器械生产许可证编号】沪食药监械生产许 20121840 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20193400101

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期：2019.2.21

修改日期：2019.6.26