

人 PAX1 和 JAM3 基因甲基化检测试剂盒(PCR-荧光探针法)产品说明书

【产品名称】

通用名称：人 PAX1 和 JAM3 基因甲基化检测试剂盒(PCR-荧光探针法)

【包装规格】

12 人份/盒、24 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人宫颈脱落细胞 DNA 中 PAX1 和 JAM3 基因的甲基化。适用于 12 种高危 HPV（hrHPV）基因型（31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68 型）检测阳性的 30 岁以上女性人群，帮助识别是否需要进行阴道镜检查，达到分流管理的目的。

DNA 甲基化是表观遗传学中的一种，是在 DNA 5'端对胞嘧啶进行共价修饰，这种修饰通常与基因沉默相关。异常的甲基化在癌症的发生发展过程中起着重要作用。在以宫颈癌患者或宫颈高度病变患者为对象的甲基化研究中发现，PAX1 (Paired boxed gene 1)基因(简称 P1)和 JAM3（junctional adhesion molecule 3）(简称 J3)基因 CpG 岛的甲基化水平比正常宫颈患者明显升高，即发生超甲基化现象。多个病理确诊的宫颈癌病理研究报告都表明可以通过检测人宫颈脱落细胞中 P1 和 J3 基因的甲基化情况来识别是否发生宫颈病变。

【检验原理】

本检测试剂盒采用重亚硫酸盐转化技术和荧光定量 PCR 技术对 P1 和 J3 基因的甲基化情况进行定性检测，具体如下：

重亚硫酸盐转化：将提取的宫颈脱落细胞 DNA 利用重亚硫酸盐转化，使未发生甲基化的胞嘧啶转变成尿嘧啶，而发生甲基化的胞嘧啶则不会发生转变；

荧光定量 PCR：利用特异性引物结合荧光探针技术，检测 DNA 样本中是否存在发生甲基化的位点。特异性引物能够选择性地扩增发生甲基化的基因，而荧光探针在 Taq 酶的作用下水解释放荧光，在实时荧光定量 PCR 仪上进行 DNA 样本的甲基化检测。

【主要组成成分】

表 1 试剂盒主要组成成分

序号	产品组成	主要成分	规格及装量	
			12 人份	24 人份
1	人 P1 和 J3 甲基化反应液	Taq 酶、Mg ²⁺ 、dNTP 等	180μL×1 管	360μL×1 管
2	人 P1 和 J3 甲基化引探混合液	引物、探针	60μL×1 管	120μL×1 管
3	人 P1 和 J3 甲基化阳性质控品	含人 GAPDH 基因保守区域的质粒、人 PAX1 和 JAM3 甲基化序列的质粒	30μL×1 管	60μL×1 管
4	人 P1 和 J3 甲基化阴性质控品	纯化水	30μL×1 管	60μL×1 管

注 1：不同批次之间同一组分不可相互替换。

注 2：试剂盒以外必需的设备及材料

- 1) 荧光定量 PCR 仪
- 2) 本产品需与天根生化科技(北京)有限公司的血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱型）（货号 DP304）（规格 200 人份/盒）和 Zymo Research 公司的 EZ-96 DNA Methylation-Lightning™ MagPrep（货号 D5046）（规格 4×96 人份/盒）配套使用。
- 3) 生物安全柜
- 4) 移液器及吸头
- 5) 离心管、离心机
- 6) PCR 反应管

【储存条件及有效期】

-20±5℃ 避光保存，有效期 12 个月。

开管后稳定保存不超过 2 个月，反复冻融次数不超过 3 次。

在不低于储存温度下，采用干冰密封运输，总运输时长不超过 5 天，到货后按照 -20±5℃ 条件下保存，产品可稳定保存至产品效期末。

生产日期和有效期至：见标签。

【适用仪器】

适用于 SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统。

【样本要求】

- 1 检测样本类型：宫颈脱落细胞。
- 2 样本收集

用宫颈采样拭子采集宫颈脱落细胞，保存在含有细胞保存液的样本管中，在常温下储存及运输。在常温下保存不超过 9 个月。

【检验方法】

1 样本处理

1.1 核酸提取：利用配套的细胞 DNA 提取试剂盒进行宫颈脱落细胞 DNA 提取(推荐提取量为 2~3mL)，提取完毕后建议立即进行重亚硫酸盐转化。若提取的 DNA 不立即使用，可将其置于 -20±5℃ 储存不超过 9 个月，推荐标准转化上样量为 1000ng，建议转化上样量不低于 200ng。

1.2 重亚硫酸盐转化：利用配套的 DNA 重亚硫酸盐转化试剂盒处理提取后的核酸，转化完成的 DNA(Bis-DNA)建议立即进行 PCR 检测，若不立即使用，可将 Bis-DNA 置于 -20±5℃ 储存不超过 9 个月。

2 试剂配制

2.1 提前将试剂盒各组分取出，室温融化，漩涡震荡 10 秒，2000rpm 离心 10 秒去除管壁上的液体。

2.2 试剂配制

2.2.1 待检测数为 n，所需要配制的反应数 N=待检测数(n)+1。计算加到反应混合物中的各个试剂的量，计算如下：

表 2 体系配制

试剂	人 P1 和 J3 甲基化反应液	人 P1 和 J3 甲基化引探混合液
体积（μL）	15×N	5×N

2.2.2 取 1.5mL 离心管配制反应体系，试剂全部加入后漩涡震荡 10 秒，2000rpm 离心 10 秒去除管壁上的液体。

2.2.3 将上述反应液按 20μL/管分装到 PCR 反应管中。

3 加样

将转化完成的 Bis-DNA、阴性质控品和阳性质控品分别加样 5μL，然后小心盖上 PCR 反应管的管盖（避免气泡产生），2000rpm 离心 10 秒，然后立即进行 PCR 扩增反应。

4 PCR 扩增程序设置

按下表设置仪器扩增相关参数并开始扩增。

表 3 PCR 扩增程序

序号	阶段	温度	时间	循环数
1	预变性	96℃	10 分钟	1
2	变性	94℃	15 秒	45
	退火	64℃	5 秒	
	延伸、荧光采集	60℃	30 秒	
3	仪器冷却	25℃	1 分钟	1

靶基因 P1：FAM 通道；靶基因 J3：ROX 通道；内标：VIC 通道（或 HEX 通道）

5 质量控制

5.1 阳性质控品：内标通道与靶基因通道检测均有 S 型扩增曲线且 $25 \leq Ct \leq 31$ 。

5.2 阴性质控品：内标通道与靶基因通道检测均无 S 型扩增曲线或检测 Ct 值 > 40 。

以上两个条件必须在同一次实验中全部满足，否则本次实验结果无效。

注：扩增曲线不成标准 S 型曲线，如无明显对数增长长期或者是线性曲线导致扩增曲线与阈值线的交叉，被认为是阴性结果。

【检验结果的解释】

阈值设定：对 SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统，推荐内标通道的阈值为 80，靶基因 P1 的阈值为 110，靶基因 J3 的阈值为 180。由于不同仪器间的差异，也可根据各基因扩增曲线升起的拐点处为阈值线，得到各反应管的 Ct 值。

各个反应管 FAM 通道（PAX1）的 Ct 值为 CtP，ROX 通道（JAM3）的 Ct 值为 CtJ，VIC 通道（GAPDH）的 Ct 值为 CtG。ΔCtP 和 ΔCtJ 为相应的靶基因与 CtG 的差值。按照表 4 进行结果判定。

表 4 反应结果的判定

	GAPDH	P1 和 J3 基因可能情况	
阳性	CtG<35	情况 1	P1 基因：ΔCtP≤6.6 J3 基因：ΔCtJ>10
		情况 2	P1 基因：ΔCtP>6.6 J3 基因：ΔCtJ≤10
		情况 3	P1 基因：ΔCtP≤6.6 J3 基因：ΔCtJ≤10
阴性	CtG<35	情况 1	P1 基因：ΔCtP>6.6 J3 基因：ΔCtJ>10
无效	CtG≥35	不予判读	

注：扩增曲线不成标准 S 型曲线，如无明显对数增长长期或者线性曲线导致扩增曲线与阈值线的交叉，被认为是无判读；无判读的 Ct 值默认为 45。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒仅用于临床辅助诊断，不能以本试剂盒检测结果作为临床诊断的唯一根据。
2. 本试剂盒仅用于 P1 和 J3 基因甲基化的定性检测，无法判断甲基化发生程度。
3. 由于肿瘤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、病人个体因素以及肿瘤级别影响。因此宫颈脱落细胞的采集、细胞 DNA 制备和储存均应按照要求进行，否则可能导致错误的检测结果。
4. 由于扩增的初始靶 DNA 含量较低，并且反应循环数较多。故应尽量避免检测环境的污染而产生假阳性信号。

【产品性能指标】

1. 阴性符合率：检测 9 份阴性参考品 N1~N9，检测结果均为阴性。
2. 阳性符合率：检测 9 份阳性参考品 P1~P9，检测结果均为对应的阳性。
3. 检测限：检测 1 份最低检测限参考品 L，重复 3 次，检测结果均为阳性。
4. 精密性：检测 2 份精密性参考品 J1 和 J2，分别做 10 次重复，检测结果均为对应的阳性，且靶基因 Ct 值的变异系数(CV)均≤5.0%。
5. 分析特异性
- 5.1 交叉反应：本产品与 SDC2、TFPI2、RNF180、Septin9、SHOX2、RASSF1A、PTGER4 常见甲基化基因和

PAX2、PAX9、JAM1、JAM2 易交叉基因均无交叉反应。同时本产品与单纯疱疹病毒 II 型、梅毒螺旋体、解脲支原体、人型支原体、淋球菌、白色念珠菌、阴道毛滴虫、沙眼衣原体、阴道加德纳氏菌、短小芽孢杆菌、鲍曼不动杆菌、耻垢分枝杆菌、脆弱类杆菌、阴沟肠杆菌、粪肠球菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、甲型链球菌等均无交叉反应。本产品对子宫内膜良性样本和卵巢良性样本具有良好的特异性，特异性为 100%；在易混淆癌肿中（子宫内膜癌和卵巢癌）的特异性均为 100%。

- 5.2 干扰试验：甲硝唑含量为 10mg/ml、壬苯醇醚栓含量为 20mg/ml、抗宫炎胶囊含量为 5mg/ml、33%人体润滑液、血红蛋白 2g/L、牛血清白蛋白 50g/L、50%宫颈粘液、白细胞含量为 10^6 细胞/mL 时均不影响试剂盒对弱阳性样本和阴性样本的检测结果。
6. 临床试验结果：在 3 家临床试验机构进行临床试验，共纳入 1968 例临床样本，针对 30 岁以上 12 种非 16/18 型高危型 HPV 感染的样本共有 974 例。考核试剂与组织病理学金标准相比，CIN2+的检测灵敏度为 89.60%，临床特异性为 96.50%；CIN3+的检测灵敏度为 95.96%，临床特异性为 87.09%。

【注意事项】

1. 本产品仅用于体外诊断，使用前请仔细阅读本说明书。
2. 实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范，实验过程分区进行(试剂准备区、样本处理区、扩增区)，实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区用品不能交叉使用。
3. 实验操作人员应接受过基因扩增或分子生物学方法检测的专业培训，具备相关的实验操作资格，实验室应具备合理的生物安全防备设施及防护程序。
4. 样本处理在生物安全柜内进行操作，防止污染环境和保护操作者。因操作易发生污染，宜采用带滤芯枪头，以免发生交叉污染。
5. 实验后的废弃物，如吸头、扩增产物等需进行无害化处理后方可丢弃。
6. 实验完毕后使用 10%次氯酸或 75%乙醇处理操作台面和移液器、离心机、PCR 仪等仪器表面，然后紫外灯照射 25~30 分钟。
7. 不同批次之间同一组分不可相互替换，请在有效期内使用本试剂盒，不使用本试剂盒中的组分进行实验可能会导致错误的结果。

【参考文献】

- [1] 《体外诊断试剂注册管理办法》(国食药监械[2014] 05 号)
- [2] 《体外诊断试剂说明书编写指导原则》
- [3] JAM3 methylation status as a biomarker for diagnosis of preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix. Oncotarget. 2015.
- [4] Paired Box-1 (PAX1) Activates Multiple Phosphatases and Inhibits Kinase Cascades in Cervical Cancer. Scientific Reports. 2019.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：北京起源聚禾生物科技有限公司
注册地址：北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地华佗路 50 号院 5 号楼 4 层 401 室
联系方式：010-52208820
生产地址：北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地华佗路 50 号院 6 号楼 4 层 A 区、北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地华佗路 50 号院 18 号楼 3 层
生产许可证编号：京药监械生产许 20230015 号

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】 国械注准 20233400253

【说明书批准及修改日期】 2023.09.04