

人类 PAX1 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】

通用名称：人类 PAX1 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

20 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒采用荧光 PCR 扩增技术，以宫颈脱落细胞提取的 DNA 为检测样本，定性检测 DNA 样本中 PAX1（Paired boxed gene1）基因特定位点甲基化情况，本试剂盒仅针对靶基因的检测性能进行验证，检测结果仅供科研参考。

在宫颈肿瘤细胞中，PAX1 基因启动子区域的 CpG 岛（CpG island）发生甲基化后会造成基因沉默或失活，提示在宫颈癌的发生中 PAX1 可能具有潜在的抑癌作用，通过检测 PAX1 基因甲基化状态，可用于辅助筛查与诊断宫颈病变的情况。同时，PAX1 的甲基化率异常升高与宫颈癌前病变的进展和宫颈癌的发生密切相关，可作为目前 TCT 与 HPV 检测结果的辅助诊断。

【检验原理】

未发生甲基化的胞嘧啶（Cytosine, C）经历一系列转化后，可转变为尿嘧啶（Uracil, U），经过 PCR 反应，尿嘧啶（U）最终转化为胸腺嘧啶（Thymine, T），即未甲基化胞嘧啶（C）最终将转化为胸腺嘧啶（T）；已发生甲基化的胞嘧啶（C）由于其甲基的保护作用，在修饰反应中不会发生变化，即甲基化胞嘧啶（C）经过转化最终仍然为胞嘧啶（C）。

依据上述差异，以PAX1基因转化后的基因组序列为模板，针对特定甲基化位点设计ARMS引物，PCR产物长度约为100bp；选择人类基因组管家基因β-actin转化后序列作为内参模板，PCR产物长度约为90bp。本试剂盒在实时荧光定量PCR平台上实现对样品DNA中PAX1基因特定位点甲基化状态的检测，具有高特异性及高灵敏度。最终结果分析时，PAX1甲基化位点检测由FAM信号指示，内控由HEX（或VIC）信号指示。PAX1基因存在甲基化判读为阳性，不存在甲基化判读为阴性。

【主要组成成份】

试剂盒采用八联管预分装设计，每个 PCR 反应管内均含有特异性引物、荧光探针、dNTPs、氯化镁、硫酸铵、氯化钾及纯化水等。反应液已预先分装于八联管反应条中，每个八联管反应条检测两份样本，即 1~4 号管、5~8 号管分别检测一份样本。

1~3 号和 5~7 号反应管为检测反应液，装有相应的 PAX1 基因甲基化检测试剂及内控试剂，检测信号由 FAM 信号指示，用于判读是否存在甲基化；内控信号由 VIC 信号指示，用于指示反应孔是否正确添加样本。4 号和 8 号管为核酸质量的外控管，内装有 PAX1 基因的外控试剂，外控信号由 FAM 信号指示，用于指示样本核酸质量。内控和外控作为对试剂、核酸质量以及操作方面的质控。

表 1 试剂盒组成

组分名称	主要内容物	体积	数量
PAX1 八联管反应条	引物、探针、镁离子、dNTPs	45 μL	12 条
Taq 酶（PAX1）	Taq DNA 聚合酶	35 μL	1 管
PAX1 阳性对照	阳性质粒 DNA、野生型 DNA	100 μL	1 管

注：不同批号试剂盒中各组分不可相互混用；反应液已预先分装于八联条中，如图 1 所示，由左至右依次为 1~8 号管。

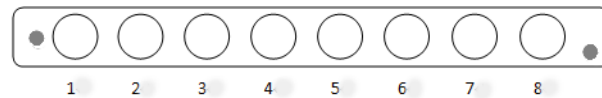


图1 八联管示意图

需自备的试剂和耗材：

1. 商业化的核酸提取试剂盒，建议选用厦门飞翔生物技术有限公司的核酸提取试剂，型号：Micro DNA（离心柱法），货号：SPG-HSMD001/ 002；
2. DNA甲基化配套试剂盒，建议选用厦门飞翔生物技术有限公司的基因组DNA亚硫酸氢盐修饰试剂，货号：SPG-DM001/002；
3. 无DNase及RNase的纯化水；
4. 无 DNase 及 RNase 移液器滤芯枪尖。

【储存条件及有效期】

1. 储存条件：试剂盒-20±5℃避光保存，有效期9个月。开瓶后-20±5℃保存不影响产品有效期。试剂盒反复冻融次数不超过5次。
2. 运输条件：本试剂盒采用低温运输，运输时间不超过一周，运输温度不超过10℃。
3. 生产日期及有效期见标签。

【适用仪器】

1. ABI7500、ABI7300Plus。
2. 注意事项：
 - 1）使用ABI仪器的探针模式设置，Reporter Dye: FAM、VIC；Quencher Dye: TAMRA；Passive Reference: NONE；
 - 2）使用ABI仪器需要手动调整阈值线，阈值线不低于20000。

【样本要求】

1. 适用标本类型：宫颈脱落细胞样本；
2. 使用商品化宫颈刷进行采集样本；样本取材时应注意先用无菌生理盐水清洗取材部位，尽量避免取到脓液；
3. 采集的样本若无法及时进行核酸提取与检测，应于 2 ~ 8℃保存不超过 3 天，或于-20±5℃保存不超过 30 天，切忌反复冻融样本；
4. 使用商品化的提取试剂盒进行基因组 DNA 提取，使用微量分光光度计测定样本 DNA 质量与浓度，其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值应在 1.7~2.2 范围内，浓度大于 25 ng/μL，总量需为 0.5~2 μg；若 DNA 质量与浓度不符合要求，应重新取材或扩大样本量重新进行 DNA 提取；
5. 提取完的 DNA 建议立即进行转化，或于-20±5℃保存，保存时间不超过 12 个月，反复冻融次数不超过 5 次；
6. 修饰后基因组建议立即用于检测，或于-20±5℃保存，保存时间不超过 30 天，反复冻融次数不超过 3 次。

【检验方法】

一、试剂准备（试剂准备区）

1. 根据待测样本数，取出试剂盒中的 PAX1 八联管反应条及 Taq 酶（PAX1）置于冰盒，移至标本处理区；建议在每次 PCR 反应中，同时进行样品及阳性对照（PC）、阴性对照（NTC，纯化水，自备）的分析。

二、标本处理（标本处理区）

1. 使用厦门飞朔生物技术有限公司的基因组 DNA 亚硫酸氢盐修饰试剂进行 DNA 的修饰转化，转化后基因组根据使用微量分光光度计测定的浓度，取部分修饰后样本用无 DNase 及 RNase 的纯化水稀释至 20 μL ，浓度为 2~5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ，即为待测 DNA；
2. 分别向 20 μL 待测 DNA、PAX1 阳性对照及阴性对照中加入 1 μL Taq 酶（PAX1），涡旋混匀后快速离心，即为扩增模板板；
3. 轻轻揭开 PAX1 八联管反应条（置于冰盒）条盖，将上述待测样品 DNA/ PAX1 阳性对照/ 阴性对照扩增模板依次取 5 μL 按照下图示例加入 PAX1 八联反应条各管，小心盖上八联反应条条盖，移至扩增检测区。

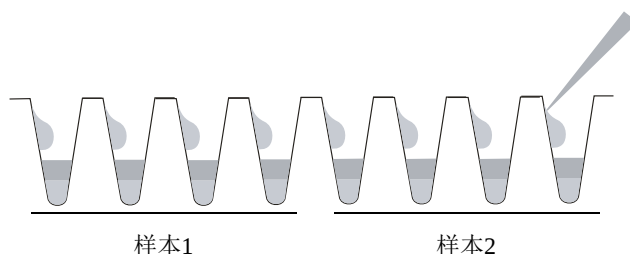


图2 八联反应条加样示意图

三、上机检测（扩增检测区）

1. 快速离心八联管反应条10秒，使加入的扩增模板收集至反应管底部；
2. 将反应条放入实时PCR仪器，PCR反应板布局可参考表2；

表2 96孔PCR反应板建议布局

反应液	管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PAX1-1	1	样品 1	样品 3	样品 5	样品 7	样品 9	样品 11	样品 13	样品 15	样品 17	样品 19	样品 21	PC
PAX1-2	2	样品 1	样品 3	样品 5	样品 7	样品 9	样品 11	样品 13	样品 15	样品 17	样品 19	样品 21	PC
PAX1-3	3	样品 1	样品 3	样品 5	样品 7	样品 9	样品 11	样品 13	样品 15	样品 17	样品 19	样品 21	PC
PAX1-4	4	样品 1	样品 3	样品 5	样品 7	样品 9	样品 11	样品 13	样品 15	样品 17	样品 19	样品 21	PC
PAX1-1	5	样品 2	样品 4	样品 6	样品 8	样品 10	样品 12	样品 14	样品 16	样品 18	样品 20	样品 22	NTC
PAX1-2	6	样品 2	样品 4	样品 6	样品 8	样品 10	样品 12	样品 14	样品 16	样品 18	样品 20	样品 22	NTC
PAX1-3	7	样品 2	样品 4	样品 6	样品 8	样品 10	样品 12	样品 14	样品 16	样品 18	样品 20	样品 22	NTC
PAX1-4	8	样品 2	样品 4	样品 6	样品 8	样品 10	样品 12	样品 14	样品 16	样品 18	样品 20	样品 22	NTC

3. 打开仪器窗口，按下图进行扩增程序设置：

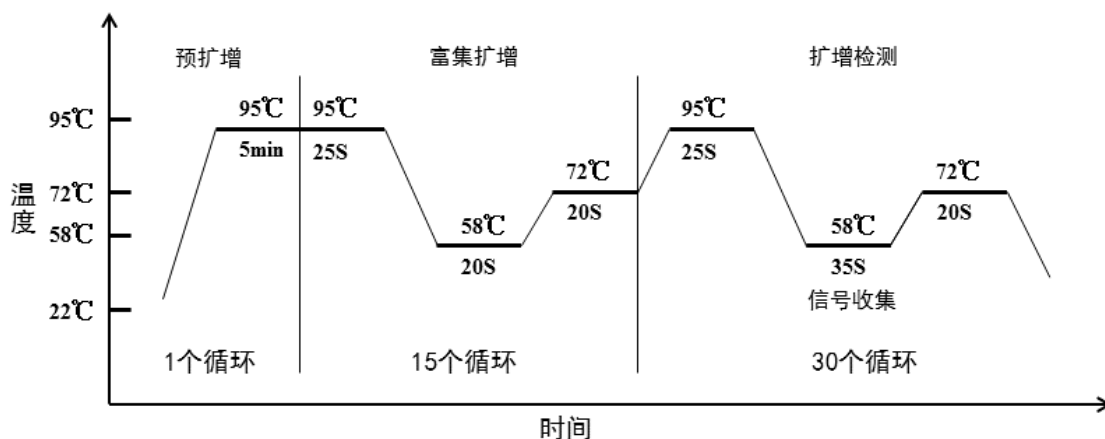


图3 PCR 扩增程序

4. 执行实时PCR，保存文件；

5. 实验结束后，隔离处理PCR反应条，严禁打开PCR管盖，以防造成污染。

【阳性判断值】

1. 通过临床实验分析，利用ROC曲线法确定本试剂盒PAX1-1、PAX1-2、PAX1-3 的 ΔCt Cut-off值为8、9、9。

2. 结果判定

1) 样品Ct值：使用仪器软件计算的扩增曲线Ct值或根据阳性对照FAM通道扩增曲线的荧光信号划定阈值线，荧光域值需设定在PCR扩增曲线的指数期，即曲线的拐点处。

2) 结果判定：

a). 样品1~3号或5~7号反应管FAM通道无扩增曲线，判读为阴性。

b). 样品1~3号或5~7号反应管FAM通道有扩增曲线时，则按以下公式计算该反应管的 ΔCt 值，根据表3进行结果判读，至少一种检测反应孔判读为阳性则表明样本存在甲基化。

公式： $\Delta Ct \text{值} = \text{检测Ct值} - \text{外控Ct值}$

式中：检测Ct值：待测样品检测反应液（1~3号或5~7号反应管）FAM信号Ct值；

外控Ct值：待测样品外控反应液（4号或8号管）FAM信号Ct值。

表3 结果判定

甲基化状态		PAX1-1	PAX1-2	PAX1-3
阳性	强阳	$\Delta Ct < 7$	$\Delta Ct < 8$	$\Delta Ct < 8$
	弱阳	$8 > \Delta Ct \geq 7$	$9 > \Delta Ct \geq 8$	$9 > \Delta Ct \geq 8$
阴性		$\Delta Ct \geq 8$	$\Delta Ct \geq 9$	$\Delta Ct \geq 9$

c). 结果判读为阳性，则该样品PAX1基因存在甲基化；结果判读为阴性，则该样品PAX1基因不存在甲基化或低于本试剂盒的检测下限。

【检验结果的解释】

1. 阴性对照（NTC）管的FAM信号应无扩增曲线升起；若FAM信号升起，则此次实验结果无效；若HEX（或VIC）信号偶尔升起，不影响检测结果的判断。
2. 阳性对照（PC）的Ct值一般<24，该值可随不同仪器的阈值设置发生波动。
3. 待测样品的外控反应管（4号或8号管）FAM信号应有扩增曲线升起，Ct值应在10~15之间，该步质控合格再进行下一步分析；若FAM信号Ct值<10，说明加入的DNA浓度过高，应稀释后再做；若FAM信号为阴性或Ct值>15，说明加入的DNA模板含有PCR抑制剂或DNA浓度过低，可以提高上样浓度或重新进行样本修饰。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检测结果仅供科研参考。
2. 阴性结果不能完全排除没有PAX1基因特定位点甲基化的存在，样本中肿瘤细胞过少、核酸过度降解或扩增反应体系中靶基因浓度低于检测限亦可造成阴性结果。
3. 肿瘤组织（细胞）存在较大异质性，不同部位取样可导致不同的检测结果。
4. 样本采集、转运及处理不合理，或试验操作及实验环境不当均有可能导致假阴性或假阳性结果。
5. 本试剂盒仅用于人类PAX1基因特定位点甲基化的定性检测。
6. 该检测仅限于说明书中提到的样本类型及检测系统（包括适用机型、核酸提取试剂、检测方法等）。

【产品性能指标】

1. 试剂盒应外观整洁，标记清晰，无漏液。试剂融化后，应澄清，无混浊，无沉淀。
2. 阳性参考品符合率为100%。
3. 阴性参考品符合率为100%。
4. 对同一份精密度参考品重复检测10次，应均能检出阳性，且Ct值变异系数（CV%）均应小于10%。

【注意事项】

1. 实验前请仔细阅读本说明书。
2. 避免反复冻融试剂盒中的试剂。
3. 检测所用DNA的质量至关重要，DNA提取后应进行质控确定提取质量，并尽快进行下一步试验或储存于-20℃以下。
4. 本试剂盒所有试剂均经过特别配制，随意替换其中任何试剂均可能影响使用效果；不同批号试剂盒成分不可相互混用。
5. 注意严格区分阳性对照及反应试剂的使用，防止污染试剂，造成假阳性结果。
6. 实验时注意防止外源DNA污染，确保加完样品DNA后再进行阳性对照的操作。推荐在制备反应试剂及添加DNA模板时，使用单独、专用的移液枪和滤芯枪头。进行反应试剂制备的地点应与添加模板的地点相隔离。
7. 实验后使用10%次氯酸或75%酒精或紫外线灯处理工作台及移液器。
8. 所有化学药品均具有潜在危险性。具有PCR实验室上岗证的人员才可使用本试剂盒。首次使用本试剂盒前，公司技术支持可对操作人员进行培训。操作时，请穿着合适的实验室工作服，佩戴防护手套。
9. 所有检测样本及试剂盒中的阳性对照应视为具有感染性物质，应小心操作；使用过的试剂盒为临床废弃物，应妥善处理。

10. 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】

：参考使用说明书；：向上；：保持干燥；：避免日晒。

【参考文献】

1. Lai HC, Lin YW, Huang TH, et al. Identification of novel DNA methylation markers in cervical cancer. *International Journal of Cancer*, 123(1):161–167, 2008.
2. Nikolaidis C, Nena E, Panagopoulou M, et al. PAX1 methylation as an auxiliary biomarker for cervical cancer screening: A meta-analysis. *Cancer Epidemiology*, 39(5):682-6, 2015.
3. Huang TH, Lai HC, Liu HW, et al. Quantitative analysis of methylation status of the PAX1 gene for detection of cervical cancer. *International Journal of Cancer*, 20(4): 513-519, 2010.
4. Lai HC, Lin YW, Huang RL, et al. Quantitative DNA methylation analysis detects cervical intraepithelial neoplasms type 3 and worse. *Cancer*, 116(18): 4266-4274, 2010.
5. Kan YY, Liou YL, Wang HJ, et al. PAX1 methylation as a potential biomarker for cervical cancer screening. *International Journal of Cancer*, 24(5): 928-932, 2014.
6. Chao TK, Yu CP, Lai CH, et al. Triage of cervical cytological diagnoses of atypical squamous cells by DNA methylation of PAX1. *Diagnostics Cytopathology*, 41(1):41-46, 2011.

【基本信息】

生产企业名称：厦门飞朔生物技术有限公司

住所：厦门市同安区西柯镇西洲路2041号四层401单元

电话：0592-7578309 传真：0592-7578319

网址：www.ispacegen.com E-mail: spacegen@ispacegen.com

售后服务单位名称：厦门飞朔生物技术有限公司

电话：400-888-9160

生产地址：厦门市同安区西柯镇西洲路2041号四层401单元、2045号4层实验室

【说明书核准日期及修改日期】 2021.04