

Septin9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: Septin9基因甲基化检测试剂盒 (PCR荧光探针法)

【包装规格】 30人份/盒、90人份/盒。

【预期用途】

本产品用于体外定性检测人外周血血浆中Septin9基因甲基化。

外周血中甲基化的Septin9基因可以通过DNA的特异扩增而被检测到^[1]。多个肠镜确诊的大肠癌病例研究报道都表明可以在病人的血浆中通过检测甲基化的Septin9基因来识别是否产生了大肠癌病变^[2]。本试剂盒适用于临床医师建议做肠镜检查,但因病人依从性差或其它医学原因无法做肠镜检查患者的辅助诊断,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Septin9基因甲基化检测试剂盒,使病人多了一种无创性大肠癌辅助诊断方法的选择。其它疾病如慢性胃炎、食管炎、非类风湿关节炎、肺癌、乳腺癌和前列腺癌患者以及孕妇中,已观察到Septin9基因甲基化(以下简称Septin9甲基化或S9)阳性测试结果^[3-5]。

【检验原理】

Septin9基因甲基化检测试剂盒包括两个步骤:

步骤1, 使用血浆处理试剂盒提取血浆中的游离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;

步骤2, 将亚硫酸盐转化的DNA (BisDNA) 做双重PCR扩增, PCR反应中的阻断剂和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Septin9基因序列特异性结合的荧光素探针可以在PCR反应中专门地检测出甲基化序列。内对照ACTB (β-actin) 基因用于评估检测中DNA量是否足够。试剂盒中提供了阳性和阴性对照, 每一次检测中都需要同时检测阴、阳性对照。

【主要组成成分】

Septin9基因甲基化检测试剂盒 (PCR荧光探针法) 包含两个试剂盒:

试剂盒I: 血浆处理试剂盒

试剂盒II: PCR试剂盒

组 分	主要成分	体 积		试剂组分	主要成分	体 积	
		30人份	90人份			30人份	90人份
1.裂解吸附液	Tris-盐酸和异硫氰酸胍	125mL × 1瓶	190mL × 2瓶	1.PCR反应液	Master Mix (dNTPs、 10 × PCR Buffer)、 Oligo Mix (引物、探针 及阻断剂)	0.8mL × 2管	0.8mL × 4管
2.洗液A	Tris-盐酸和异硫氰酸胍	60mL × 1瓶	90mL × 2瓶				
3.磁珠	磁珠	4mL × 1瓶	12mL × 1瓶				
4.洗液B	无核酸酶的水	7mL × 1瓶	21mL × 1瓶				
5.洗脱液	Tris-盐酸	6mL × 1管	9mL × 2管	2.聚合酶	Taq DNA 聚合酶	85 μL × 1管	85 μL × 2管
6.亚硫酸盐溶液	亚硫酸氢铵	1.9mL × 4管	1.9mL × 12管	3.阳性对照品	Jurkat DNA、BSA和 1 × TE Buffer	3.6mL × 6管	3.6mL × 6管
7.保护液	6-羟基-2,5,7,8-四甲基 苯并二氢吡喃-2-羧酸, 四氢呋喃醇	1mL × 1管	1.5mL × 2管	4.阳性对照品	HeLa DNA、BSA和 1 × TE Buffer	3.6mL × 6管	3.6mL × 6管

以下的试剂和耗材是本试剂盒中不包含, 但对该试验必需的:

- 无水乙醇 (分子生物级别, 浓度高于99.5%);
- 15mL聚丙烯离心管带有圆锥型底, 无菌;
- 2.0mL微量离心管, 圆底带有联体螺旋型的密封盖;
- 带有过滤装置的枪头, 包括2-100 μL、50-1000 μL规格;
- 连续分液器枪头, 包括0.5mL、1mL、10mL、25mL;
- 一次性移液器, 可以非无菌包装, 长度15cm, 体干直径5mm,

能吸取5mL液体;

- 存储DNA的96孔板; 0.1 mL;
- 96孔板密封胶;
- 96孔板密封胶的手动压膜器;
- 可再封闭型塑料袋; 10 × 15 cm;
- 可竖立的5mL密封冰冻储存管;
- 采血管: 如BD的10mL, K₂EDTA负压抗凝管。

【储存条件及有效期】

1. 血浆处理试剂盒在15~30℃条件下储存, PCR试剂盒在-25~-15℃条件下储存, 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. 试剂盒I: 血浆处理试剂盒

血浆处理试剂盒于室温 (15~30℃) 存储。亚硫酸盐溶液对氧气敏感, 只能使用未开封的溶液, 开封后未用完的残液应丢弃。

加无水乙醇后的洗液A和洗液B室温 (15~30℃) 可存储6周。其它试剂开封后室温 (15~30℃) 条件下可存储6周。

3. 试剂盒II: PCR试剂盒

PCR试剂盒于-25~-15℃存储。每一管PCR反应液只能使用两次, 使用两次后剩余的残液应丢弃。在第一次使用后, 所有的试剂在-25~-15℃可存储6周。

4. 生产日期及有效期至详见具体的产品标签。

【适用仪器】

1、普通实验室设备

以下的实验室常规设备是本试剂盒使用所必要的。所有的实验室设备必须按照设备供货商的要求进行标定、操作以及维护。

- 能容纳15mL离心管和2mL离心管的试管架;
- 涡流混匀器; 水浴锅, 37℃;
- 量程从10-100 μL, 100-1000 μL的移液器;
- 连续分液器 (加样枪), 可以调节所分液体积;
- 多通道排枪 (加样枪);
- 轮状旋转混匀器 (混匀15毫升试管);
- 能容纳2mL离心管的恒温振荡孵育器;
- 100mL 量筒, 或者50mL的移液器;
- 台式离心机, 能离心1.5/2.0mL 的离心管;
- 板式离心机, 可以离心96孔板。

2、需要的特殊设备和耗材

以下的特殊设备和耗材是本试剂盒检测所必要的, 不能被其它设备所取代。

2.1 当使用ABI7500仪器做检测时, 需要:

- Applied Biosystems 7500 PCR仪器 (Life Technologies Co., 货号 4351105 or 4351104), 附带 Sequence Detection Software v2.0或v1.4软件模块;
- MicroAmp®EnduraPlate™ Optical 96-Well Clear Reaction Plates with Barcode, 带有条码的透明96孔板。20块板包装的货号4483354, 500块板包装的货号4483352;
- MicroAmp 96孔板透明封膜, Life Technologies公司货号: Cat.No. 4360954 (25片);

2.2 当使用SLAN-96S仪器做检测时, 需要:

- SLAN-96S荧光定量PCR仪 (上海宏石医疗科技有限公司), 附带 8.3.1软件版本;
- 其它可以兼容实时定量PCR仪器的配件;
- 磁珠分离架: DynaMag-15 magnet (Invitrogen.Cat.No.123.01D);
- 磁珠分离架: DynaMag-2 magnet (Invitrogen.Cat.No.123.21D)。

【样本要求】

血样的收集和存储按以下执行:

1、全血采集

采血量: 10mL。

采血方法: 使用BD Vacutainer® K₂EDTA 10mL采血管采血 (亦可使用BD Vacutainer® K₂EDTA 5mL采血管, 采集2管)。

采集后的血样应立即处理。若不能立即处理, 应在2~8℃保存, 保存时间不超过24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15cm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或者血清移液管将3.5mL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18小时。

【检验方法】

1. 工作液的制备

1.1 90人份工作液的制备

1.1.1 制备洗液A

- 将90mL无水乙醇加入到洗液A瓶中。盖紧瓶盖，颠倒5次，彻底混匀，避免产生气泡。在瓶侧面的标签上标记好稀释时间，签名并在“已加入无水乙醇”的方块“□”内标记“X”。
- 新配置的洗液A在室温（15~30℃）可保存6周。

1.1.2 制备洗液B

- 将120mL无水乙醇加入到洗液B瓶中。盖紧瓶盖，颠倒5次，彻底混匀，避免产生气泡。在瓶侧面的标签上标记好稀释时间，签名并在“已加入无水乙醇”的方块“□”内标记“X”。
- 新配置的洗液B在室温（15~30℃）可保存6周。

1.2 30人份工作液的制备

1.2.1 制备洗液A

- 将60mL无水乙醇加入到洗液A瓶中。盖紧瓶盖，颠倒5次，彻底混匀，避免产生气泡。在瓶侧面的标签上标记好稀释时间，签名并在“已加入无水乙醇”的方块“□”内标记“X”。
- 新配置的洗液A在室温（15~30℃）可保存6周。

1.2.2 制备洗液B

- 将40mL无水乙醇加入到洗液B瓶中。盖紧瓶盖，颠倒5次，彻底混匀，避免产生气泡。在瓶侧面的标签上标记好稀释时间，签名并在“已加入无水乙醇”的方块“□”内标记“X”。
- 新配置的洗液B在室温（15~30℃）可保存6周。

2. 血浆中DNA提取及亚硫酸盐转化

2.1 血浆、阴性对照品和阳性对照品的融化

- 把一个阴性对照品和一个阳性对照品置于室温（15~30℃），融化30分钟。
- 如果是冰冻的血浆样本，同样置于室温（15~30℃），融化30分钟。
- 上述样品融化后，必须在60分钟内进行裂解步骤。

2.2 裂解

- 将3.5mL血浆样本、阳性对照品、阴性对照品分别转移到事先标记好的15mL离心管中；依次加入3.5mL裂解吸附液。盖紧离心管盖，涡旋混匀。
- 离心管室温（15~30℃）中放置10±1分钟。

2.3 DNA结合

注意：在使用磁珠时应确保磁珠均匀悬浮。磁珠数目差异会导致结果错误。为了保证正确的磁珠浓度，在移液之前需用涡旋混匀器彻底混匀磁珠，直到瓶底见不到沉淀物。同时，在移液步骤中，也要保证磁珠均匀悬浮。

- 依次将下列试剂添加到15mL离心管中：90 μL 磁珠（新鲜悬浮）；2.5mL 无水乙醇（分子生物学级，纯度≥99.5%）。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45±5分钟，旋转角度大约35~45°。

2.4 DNA洗涤

注意：在洗涤步骤之前，预先将恒温振荡器调至80℃，用于后续洗脱和亚硫酸盐转化步骤。

- 将15mL离心管放置于DynaMag™-15磁性试管架上吸附5~10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DynaMag™-15磁性试管架上）。若血浆样本中磁珠不能被DynaMag™-15mL磁性试管架有效分离，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DynaMag™-15磁性试管架上进行磁珠分离。如仍不能有效分离磁珠，可将15mL离心管置于55℃（50~60℃）水浴，10分钟，放置DynaMag™-15磁性试管架上再次磁珠分离。
- 加入1.5mL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2.0mL离心管中。再次用移液管吸取残留磁珠悬浮液，将其转移至2.0mL离心管中。
- 将2.0mL离心管放置于DynaMag™-2磁性试管架上吸附2~6分钟。用一次性移液管尽量除去液体，注意不要吸取磁珠。

- 短暂离心2.0mL离心管。放置2.0mL离心管在DynaMag™-2磁性试管架上重新吸附2~6分钟，用10~100 μL移液器尽量除去残余液体。

2.5 洗脱

- 将离心管移至无磁性试管架上。涡旋混匀洗脱液，加入100 μL洗脱液至各个离心管中，盖紧离心管，涡旋混匀，重悬磁珠。
- 将离心管放置于恒温振荡器中，转速设为1000±100rpm，温度设为80℃，震荡10±1分钟。
- 短暂离心离心管。将离心管置于DynaMag™-2磁性试管架上2~6分钟。将全部洗脱液移至新的2.0mL离心管中（约100 μL DNA洗脱液）。

2.6 DNA的储存

若提取的DNA不立即使用，可将其置于2~8℃，储存不超过24小时。不能冰冻提取的DNA。

2.7 亚硫酸盐转化

注意：亚硫酸盐溶液对氧气敏感。只能使用未开封的溶液，开封后未用完的残液应丢弃。

- 在含有DNA洗脱液的2.0mL离心管中依次加入150 μL亚硫酸盐溶液，25 μL保护液。
- 盖紧离心管后，涡旋混匀离心管中的反应液。短暂离心离心管。将离心管置于恒温振荡器中，80℃恒温孵育45±5分钟，不要振荡。45±5分钟后，立即将离心管取出。
- 将恒温振荡器温度调至23℃待后续使用。

2.8 结合

注意：充分混匀磁珠是试验成功的关键因素，磁珠数目的差异将产生错误结果。为了确保磁珠浓度均匀，移液前用涡旋混匀器充分混匀磁珠至瓶底无明显沉淀物。同时在移液过程中，也要保证磁珠的均匀悬浮。

- 短暂离心上述反应后的2.0mL离心管。在离心管中依次加入：1000 μL 洗液A；20 μL 磁珠（新鲜悬浮）。涡旋混匀。

- 将离心管置于23℃的恒温振荡器中，调整转速为1000±100rpm，孵育45±5分钟。
- 短暂离心离心管，将离心管置于DynaMag™-2磁性试管架2~6分钟。用一次性移液管尽量去除液体。

2.9 第一次洗涤

- 将离心管从磁力架上取下，加入800 μL洗液A。涡旋混匀重悬磁珠，短暂离心离心管。
- 将离心管置于DynaMag™-2磁性试管架2~6分钟。用一次性移液管尽量去除液体。

2.10 第二次洗涤

- 将离心管从磁力架上取下，加入800 μL洗液B。涡旋混匀重悬磁珠。短暂离心离心管。
- 将离心管置于DynaMag™-2磁性试管架2~6分钟。用一次性移液管尽量去除液体。

2.11 第三次洗涤

- 将离心管从磁力架上取下，加入400 μL洗液B。涡旋混匀重悬磁珠。短暂离心离心管。
- 将离心管置于DynaMag™-2磁性试管架2~6分钟。用一次性移液管尽量去除液体。
- 短暂离心离心管。
- 将离心管置于DynaMag™-2磁性试管架2~6分钟，用10~100 μL移液器尽量除去残余液体。
- 短暂离心离心管。
- 将离心管置于DynaMag™-2磁性试管架2~6分钟，用10~100 μL移液器尽量除去残余液体。

2.12 干燥

注意：不要增加干燥时间和温度。过度干燥会降低BisDNA回收率。

打开离心管管盖。将离心管置于恒温振荡器中，23±2℃静置10分钟待沉淀干燥，不要震荡。

2.13 洗脱

- 将离心管移至无磁性试管架上，加入60 μL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，23±2℃，1000±100rpm孵育10分钟。
- 短暂离心离心管。将离心管置于DynaMag™-2磁性架2~6分钟。
- 用10~100 μL移液器将洗脱液（约60 μL）转移至96孔板中，并使用粘性薄膜和封膜器密封96孔板。

2.14 经亚硫酸盐转化的DNA储存

若提取的DNA不立即使用，可2~8℃储存24小时，或-25~-15℃储存72小时。

3. PCR设置

3.1 PCR预反应液的准备

- 根据反应样本量，融化1到2管PCR反应液。涡旋混匀PCR反应液10~15秒，短暂离心。

- 每个PCR反应需要32 μL PCR反应液和1.6 μL聚合酶。按比例将相应体积的PCR反应液和聚合酶加入到2.0mL的离心管中。涡旋混匀PCR预反应液，短暂离心离心管，将管壁液滴离下来。
- 注意：配置好的PCR预反应液应立即使用。PCR反应液和聚合酶使用完毕立即复冻。
- 3.2 PCR反应板准备（Applied Biosystems 7500）
- 将30 μL PCR预反应液加至选定好的96孔板的板孔中。加入30 μL的BisDNA至PCR板对应的孔中。
- 用MicroAmp® Optical Adhesive Film胶膜密封，1000 ± 100rcf离心1分钟。密封后的PCR板可在2 ~ 8℃放置不超过4小时。

4. Applied Biosystems 7500 PCR仪上机

4.1 软件要求

PCR过程使用Applied Biosystems 7500 PCR仪，建议版本号为SDS V2.0.5以及SDS V1.4软件。

4.2 PCR反应板加载

PCR预反应液中不包含ROX或其它染料。因此，Passive Reference设置必须为“none”，Septin9选取FAM荧光通道，ACTB选取JOE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	升降温速率	荧光信号收集
阶段1	活化	94℃	20分钟	40%	
阶段2	45个循环	62℃	5秒	80%	X
		55.5℃	35秒	80%	
		93℃	30秒	40%	
阶段3	降温	40℃	5秒	80%	

注：X代表荧光收集阶段

4.3 分析条件设置

4.3.1 SDS V2.0.5版本软件设置

设置基线10~22个循环，设置Septin9阈值30000，ACTB阈值14000。

4.3.2 SDS V1.4版本软件设置

设置基线10~22个循环，设置Septin9 阈值100000，ACTB阈值60000。

4.4 用对照样品验证PCR反应的有效性（ABI 7500）

如果对对照样品全部的PCR反应满足表2中所列标准，并且病人样本随同阴性和阳性对照样本在同一个PCR反应中测定，该PCR反应被验证为是有效的。

4.5 待测样本PCR反应结果的解释（ABI 7500）

待测样本结果解释如表3所示。如果内对照ACTB显示加入DNA的量足够的话（ACTB Ct值见表3中），那么septin9的PCR结果视为本次PCR反应结果。如果ACTB的Ct值大于表3中所设的临界值，那么定义该PCR反应为“无效”。

5. SLAN-96S PCR仪上机

5.1 软件要求

PCR过程使用SLAN-96S PCR仪。

5.2 PCR反应板加载

Septin9选取FAM荧光通道，ACTB选取JOE通道，ROX通道不选取，如表4设置反应程序：

表4：反应程序

步骤	描述	温度	时间	升降温速率	荧光信号收集
阶段1	活化	94℃	20分钟	0.7℃/秒	
阶段2	45个循环	62℃	5秒	1.3℃/秒	X
		55.5℃	35秒	1.3℃/秒	
		93℃	30秒	0.7℃/秒	
阶段3	降温	40℃	5秒	1.3℃/秒	

注：X代表荧光收集阶段

5.3 分析条件设置

注意：仅适用于8.3.1版本

设置基线10~22个循环，设置Septin9阈值0.05，ACTB阈值0.05。

5.4 用对照样品验证PCR反应的有效性（SLAN-96S）

如果对对照样品的PCR反应满足表2中所列标准，并且病人样本随同阴性和阳性对照样本在同一个PCR反应中测定，该PCR反应被验证为是有效的。

5.5 对待测样本PCR反应结果的解释（SLAN-96S）

待测样本结果解释如表3所示。如果内对照ACTB显示加入DNA的量足够的话（ACTB Ct值见表3中），Septin9的PCR结果视为本次PCR反应结果。如果ACTB的Ct值大于表3中所设的临界值，那么定义该PCR反应为“无效”。

【参考区间】

使用Septin9基因甲基化检测试剂盒（PCR荧光探针法）对218例临床研究样本进行检测，确定Septin9和ACTB的最佳临界值，并通过临床试验样本进行验证。

临床研究：Septin9的参考值采用ROC曲线法制定。为了确定最佳临界点，采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cut-off值。根据软件使用ROC法进行计算，Cutoff值为41.0时准确性最优（灵敏度和特异性分别为79.3和94.3%）。检测结果显示：全部218例临床研究样本的ACTB基因Ct值范围在23.0~31.0。ACTB基因的Ct平均值为28.44，样本间变异SD=1.21个Ct，故ACTB的参考范围为≤32.1。

临床试验：586例血浆样本（大肠癌样本291例，肠镜正常样本295例）数据表明：与临床研究的结论相一致，当Septin9的cut-off值为41.0时，该试剂盒的检测灵敏度和特异性最优（灵敏度和特异性分别为76.63%和95.93%，见表5）。

因此当阴、阳性对照的septin9与ACTB的Ct值结果均符合表2要求时，待测样本的判定标准参见表6。

【检验结果的解释】

如果对对照品的Septin9和ACTB的Ct值结果满足表2中所列标准，并且待测样本随同阴性和阳性对照品在同一个PCR反应中测定，该PCR反应被验证是有效的。

根据待测样本在PCR仪器上测定得到的Septin9和ACTB的Ct结果，按照表6中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≤32.1，Septin9的Ct≤41.0时，Septin9基因甲基化检测结果为阳性。

阴性结果：待测样本ACTB的Ct结果≤32.1，Septin9的Ct > 41.0或无检出（Ct无显示）时，Septin9基因甲基化检测结果为阴性。

无效结果：如果ACTB的Ct结果 > 32.1，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. 两个试剂盒需联合使用，以确保反应有效。
3. 该产品的有效性仅针对对于BD Vacutainer®K₂EDTA采血管。对于其它血样的收集方式有效性没有做测试。
4. 该产品的使用者应该是接受过PCR反应训练的试验者。
5. 由于大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。
6. 此结果不能作为确诊大肠癌的证据。任何甲基化Septin9基因检测呈阳性的患者还需接受结肠镜或乙状结肠镜的进一步检查以便确诊。
7. 临床试验结果显示：腺瘤与息肉的检出率分别为：腺瘤：9.81%（21/214）息肉：（6/116）5.17%，检

表5：临床试验的灵敏性和特异性

cut-off值	灵敏性	特异性
41.0	76.63%（223/291）	95.93%（283/295）

表6：待测样本的判定标准

Septin9甲基化检测结果	Septin9的Ct	ACTB的Ct
阳性	Ct≤41.0	Ct≤32.1
阴性	无Ct或Ct > 41.0	Ct≤32.1
无效	任何情况	Ct > 32.1

- 出率较低，与正常样本的检出率4.07%（12/295）无显著差异，故此试剂盒不能作为结直肠腺瘤和息肉辅助诊断。
- 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。
 - 由于扩增的初始靶DNA含量极低（6pg~8000pg/mL），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

外包装盒，组分齐全，包装外观清洁、无泄漏、无破损。标志、标签字迹清楚。

1.2 阳性符合率

检测3份阳性参考品（P1-P3），结果均应为Septin9扩增曲线正常且为阳性（Ct≤41.0），同时内参ACTB扩增曲线正常且Ct≤32.1。

1.3 阴性符合率

检测3份阴性参考品（N1-N3），结果均为Septin9阴性（无Ct），N1的内参ACTB阴性（无Ct或Ct>38），N2、N3的内参ACTB扩增曲线正常且Ct≤37.2。

1.4 最低检出限

检测1份检测限参考品（S），Septin9扩增曲线正常且为阳性（Ct≤41.0），同时内参ACTB扩增曲线正常且Ct≤29.0。

1.5 精密度

检测1份精密度参考品（J），10次重复，结果全部为Septin9扩增曲线正常且为阳性（Ct≤41.0），同时内参ACTB扩增曲线正常且Ct≤29.0，计算所测得Septin9和ACTB Ct值的变异系数（CV），均不应高于5%。

1.6 稳定性

近效期的产品检测阳性参考品、阴性参考品、检测限参考品、精密度参考品，应分别符合1.2-1.5的要求。

备注：企业参考品的组成详见表7。

表7：企业参考品的组成

类型	编号	组成
阳性参考品（3.5毫升/管）	P1	TE+ BSA + Jurkat细胞DNA + HeLa细胞DNA
阳性参考品（3.5毫升/管）	P2	TE+ BSA + Jurkat细胞DNA + HeLa细胞DNA
阳性参考品（3.5毫升/管）	P3	TE+ BSA + Jurkat细胞DNA + HeLa细胞DNA
阴性参考品（3.5毫升/管）	N1	TE+ BSA
阴性参考品（3.5毫升/管）	N2	TE+ BSA + Jurkat细胞DNA
阴性参考品（3.5毫升/管）	N3	TE+ BSA + Jurkat细胞DNA
精密度参考品（3.5毫升/管×10）	J	TE+ BSA + Jurkat细胞DNA + HeLa细胞DNA
检测限参考品（3.5毫升/管）	S	TE+ BSA + Jurkat细胞DNA + HeLa细胞DNA

2. 临床灵敏性和特异性

以肠镜/病理为金标准。其中，以金标准确定为不同临床分期的大肠癌为病变组（共291例），以正常人和良性消化系统疾病为对照组。其中正常人为295例，良性消化系统疾病患者共438例，包括息肉样本116例、腺瘤样本214例、其它肠道疾病108例。

2.1 该试剂盒和金标准（正常样本和大肠癌样本）比对结果显示：291例大肠癌样本中有223例样本检出阳性结果，该试剂盒的临床灵敏度为76.63%（CI 95%：71.34%-81.37%）；295例正常样本中有12例样本检出结果为阳性，该试剂盒的临床特异性为95.93%（CI 95%：93.00%-97.86%）。

2.2 该试剂盒和金标准（良性消化系统疾病和大肠癌样本）比对结果显示：291例大肠癌样本中有223例样本检出阳性结果，该试剂盒的临床灵敏度为76.63%（CI 95%：71.34%-81.37%）；438例良性消化系统疾病样本中有31例样本（息肉样本6例、腺瘤样本21例、其它肠道疾病4例）检出结果为阳性，试剂盒的临床特异性为92.92%（CI 95%：90.10%-95.14%）。

3. 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（100ng/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，40mg/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

- 应减少实验样本中的交叉污染，包括DNA提取，亚硫酸盐转化和DNA洗涤等过程。
- 为防止在DNA提取过程中核酸酶混入样本，建议使用一次性的移液管和移液器头，这样可以避免不同样本间的交叉污染。检测实验应该由精通DNA提取和real-time PCR分析的专业实验人员完成。
- 为防止PCR扩增产物的污染，建议严格区分PCR步骤，分为PCR扩增前（血浆DNA的提取，纯化和PCR设置）和PCR扩增（如real-time PCR）。使用过的PCR平板应该置于一个不利于PCR产物扩散的地方，例如使用过的PCR平板从PCR仪取出之后，应立即置于自封袋中，封紧，并丢弃在指定的容器中。绝不要把使用后的PCR平板放在PCR仪外面，也不要打开用过的PCR平板。

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。

【参考文献】

- Robert Grutzmann, Bela Molanretc, Sensitive Detection of Colorectal Cancer in Peripheral Blood by Septin 9 DNA Methylation Assay. PLoS ONE, November 2008, Volume 3, Issue 11, e3759;
- Catherine Lofton—Day, Fabian Model.etc, DNA-Methylation Biomarkers for Blood-Based Colorectal Cancer Screening, Clinical Chemistry 54:2 (2008) ;
- Robert Grutzmann, Bela Molanr etc, Sensitive Detection of Colorectal Cancer in Peripheral Blood by Septin 9 DNA Methylation Assay. PLoS ONE, November 2008, Volume 3, Issue 11, e3759;
- Vera Schellerer, Reimo Tetzner.etc, Assessment of the clinical utility of an improved blood-based Septin9 test for early detection of CRC in patients with co-morbidities. (2012) Universitätsklinikum Erlangen, Chirurgische Klinik, Krankenhausstrasse 12, 91054 Erlangen;
- Tomasz Powrózek • Paweł Krawczyk etc, Septin 9 promoter region methylation in free circulating DNA—potential role in noninvasive diagnosis of lung cancer: preliminary Report. Med Oncol (2014) 31:917.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：博尔诚（北京）科技有限公司

住 所：北京市北京经济技术开发区宏达南路18号院3号楼10层

生产地址：北京市北京经济技术开发区宏达南路18号院4号楼3层、2号楼501-504室、1幢-1层-101 A区和B区

邮 编：100176

传 真：010-67880132

网 址：http://www.biochainbj.com/

售后服务单位名称：博尔诚（北京）科技有限公司

客服电话：400-650-3186

【医疗器械生产许可证编号】 京食药监械生产许20100048号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】 国械注准20153401481

【说明书核准日期及修改日期】 2021年04月15日