

人Septin9基因甲基化DNA检测试剂盒 (PCR 荧光法) 说明书

【产品名称】

通用名称：人 Septin9 基因甲基化 DNA 检测试剂盒（PCR 荧光法）

【包装规格】

20 人份/盒；50 人份/盒；100 人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人血浆中Septin9基因甲基化DNA。

适用人群限于临床医师建议做肠镜检查，因病人依从性差或其他医学原因无法做肠镜检查的患者，用于结直肠肿瘤的辅助诊断。检测结果仅供参考，检测结果阳性不作为大肠癌确诊的证据，检测结果阴性也不能排除大肠癌的可能。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。

具体临床应用时，临床医生须结合病例实际情况判断，不能以本试剂盒检测结果作为临床诊断的唯一依据。

其他疾病如肝癌、胃癌、肺癌和食管癌中，也观察到Septin9基因甲基化阳性的情况。

结直肠癌术后患者，检测结果和结直肠癌临床诊断金标准的一致性不佳。本试剂盒不适用于结直肠癌术后患者的检测。

Septin 是一类具GTPase活性的保守骨架蛋白基因家族，人类至少有14个家族成员，分别命名为Septin1~14，其中Septin9定位于17q25，编码Septin9蛋白。研究发现Septin9基因的转录产物有多个翻译起始位点并存在变异剪接，能产生18种不同蛋白产物^[1]，Septin9作为与细胞质分裂相关的家族成员，其表达与结直肠癌的发生发展高度相关，研究发现，Septin9在人正常结直肠组织和结直肠肿瘤组织中存在明显表达差异，DNA甲基化是调节Septin9基因表达的主要机制。其中Septin9-v2 启动子区的CpG 岛高度甲基化可在外周血等样本中检测到，使其成为结直肠癌的一种生物标记^[2-6]。

【检验原理】

本试剂盒结合了亚硫酸盐修饰和Taqman探针两种技术，利用亚硫酸盐使未甲基化的C碱基转换为U碱基，在PCR扩增过程中，再转换为T碱基，而甲基化的C碱基保持不变，因此可以区分甲基化和未甲基化的C碱基；利用Taqman探针对扩增产物进行检测，通过优化的反应体系和高特异Taq酶的使用，在实时荧光PCR平台上实现对样品中甲基化DNA的特异检测。试剂盒采用多色荧光检测体系其中设计，FAM荧光检测Septin9基因甲基化状态，CY5荧光检测内标基因水平。

【主要组成成分】

表1 试剂盒组成（20人份/盒）

名称	规格	数量	主要成分	保存条件
PCR 反应液	310μL/管	1管	PCR反应组分，扩增引物，标记探针	≤-20℃
DNA 聚合酶	7μL/管	1管	热启动DNA聚合酶	≤-20℃
质控品	20μL/管	1管	含Septin9甲基化DNA的质粒	≤-20℃
阴性对照	50μL/管	1管	纯化水	≤-20℃

表2 试剂盒组成（50人份/盒）

名称	规格	数量	主要成分	保存条件
PCR 反应液	385μL/管	2管	PCR反应组分，扩增引物，标记探针	≤-20℃
DNA 聚合酶	17μL/管	1管	热启动DNA聚合酶	≤-20℃
质控品	20μL/管	1管	含Septin9甲基化DNA的质粒	≤-20℃
阴性对照	50μL/管	1管	纯化水	≤-20℃

表3 试剂盒组成（100人份/盒）

名称	规格	数量	主要成分	保存条件
PCR 反应液	770μL/管	2管	PCR反应组分，扩增引物，标记探针	≤-20℃
DNA 聚合酶	32μL/管	1管	热启动DNA聚合酶	≤-20℃
质控品	20μL/管	1管	含Septin9甲基化DNA的质粒	≤-20℃
阴性对照	50μL/管	1管	纯化水	≤-20℃

质控品为含 Septin9 甲基化 DNA 的质粒，不具有任何生物活性，因此对人体不会造成危害。以上各成分中不包括任何动物、病原体、人源的组织和体液等生物材料，因此可以保证产品在运输、使用过程中对使用者和环境的安全。不同批号试剂盒中各组分在未证明能满足本试剂盒性能指标之前不要互换。

需要但不提供的试剂：

天根生化科技(北京)有限公司磁珠法血清游离 DNA 提取试剂盒，货号：DP340。

ZYMO RESEARCH 生物公司 EZ DNA Methylation-Direct™ Kit, 货号：D5020。

【储存条件及有效期】

- 在-20℃及以下储存，有效期为 9 个月。
- 本试剂盒经验证反复冻融 5 次内有效，超过 5 次未验证；试剂盒按照发货方式包装放在 40℃摇床转速为 200 转/分钟模拟运输 4 天内有效，超过 4 天未验证；2~8℃质控品和阴性对照开瓶 7 天有效，超过 7 天未验证。
- 生产日期及使用期限见产品标签。

【适用仪器】

罗氏诊断 LightCycler® 480 实时荧光定量 PCR 仪、生命科技 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪、宏石 SLAN-96S 实时荧光定量 PCR 仪、宏石 SLAN-48P 实时荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

- 推荐样品类型：血浆

按临床操作规程，用采血管（EDTA K2）收集全血后应及时分离收集血浆。如不能立即分离血浆，血浆应保存于 2~8℃，保存时间不超过 24 小时，不能冰冻血浆。

- 血浆的制备和保存

禁止使用离心机的刹车功能，以防止血细胞的破坏；采血后缓慢摇动试管几次，以混匀血液，以 2000~3000rpm 离心 10min，取血浆置于标记好的试管内。

采集的血浆，请尽快提取 DNA；如果不能立即提取 DNA，置于 2~8℃保存 48 小时，≤-20℃保存 12 个月，标本反复冻融 5 次内有效。

- DNA 提取

取血浆 3.0mL 用于 DNA 提取。使用商业化的 DNA 提取试剂盒，天根生化科技(北京)有限公司磁珠法血清游离 DNA 提取试剂盒，提取体积不小于 3.0mL 血浆，V2022.09.01

严格按照试剂盒说明书操作。

4. 亚硫酸盐修饰

提取的 DNA，取 20μL 用于亚硫酸盐修饰。使用商业化的 DNA 亚硫酸盐修饰试剂盒，ZYMO RESEARCH 生物公司 EZ DNA Methylation-Direct™ Kit。亚硫酸盐修饰过程请严格按照试剂盒说明书操作，修饰后的 DNA 立即用于检测；如果不能立即检测，≤-20℃保存 6 个月。

【检验方法】

建议在每次临床标本检测时，同时分析质控品、阴性对照。

- 取亚硫酸盐修饰后待测样本 DNA。
- 试剂盒室温解冻，从试剂盒中取出 PCR 反应液和 DNA 聚合酶，颠倒混匀。
- 按检测标本数量，加上质控品和阴性对照，计算需要的 PCR 反应液和 DNA 聚合酶体积，以下表为例，如果检测 3 个样本，分别取 75μL PCR 反应液和 1.5μL DNA 聚合酶，加入一个新的 EP 管中，颠倒混匀，瞬时离心。

样本数量	PCR 反应液(μL)	DNA 聚合酶(μL)
1	45	0.9
2	60	1.2
3	75	1.5
4	90	1.8
:	:	:
N	15 (N+2)	0.3 (N+2)

- 把 PCR 反应管按顺序摆放在 PCR 架架上（做好标记），轻轻揭开 PCR 反应管的管盖。分别取上述混匀的试剂（PCR 反应液和 DNA 聚合酶）15μL 加入 PCR 反应管，再加入 DNA 样本/质控品/阴性对照 5μL，颠倒混匀（切勿振荡混匀），小心盖上反应管盖，瞬时离心。
- 做好标记（使用 ABI7500 等检测系统时，不要在反应管盖上做任何标记，以免影响荧光检测），瞬时离心后把 PCR 反应管放入仪器。
- 打开仪器设置窗口，设置 PCR 扩增与信号收集程序。
 - 第一阶段：95℃，10 分钟，1 个循环；
 - 第二阶段：95℃，15 秒，60℃，31 秒，5 个循环；
 - 第三阶段：95℃，15 秒，57℃，31 秒，40 个循环；
信号收集：第三阶段 57℃时收集 FAM 和 CY5 信号。

注！本扩增程序仅供参考，某些 PCR 设备扩增程序可能需要作适当调整，具体请咨询本公司技术服务。

- 保存文件，运行程序。

【阳性判断值】

收集临床医院检测 Septin9 基因甲基化的结果为阴性 120 份，以及 Septin9 基因甲基化的结果为阳性 100 份。CY5 的阳性判断值以百分位数法确定，CY5 的阳性判断值 Ct 值为小于等于 35；FAM 的阳性判断值以 ROC 曲线确定，FAM 荧光信号的扩增曲线为光滑的“S”形，且 Ct 值<35，提示 Septin9 基因甲基化阳性。各医院或实验室可根据各自实验室的条件建立相应的阳性判断值。

【检验结果的解释】

- 确定实验是否可信：
 - 确定是否有 CY5 信号，若无 CY5 信号，提示加入的 DNA 含有 PCR 抑制剂或 DNA 处理失败，需要重新提取 DNA 并亚硫酸盐处理；质控品反应管 FAM 和 CY5 均应有信号，阴性对照应无 FAM 和 CY5 信号。
- 确认未选择校正荧光参照，设置并分析 FAM 荧光信号，需要同时选择质控品反应管和样品反应管，根据实际扩增曲线情况确定扩增曲线的拐点，根据拐点位置调整基线高度，使阈值线刚好超过正常阴性对照（NC）的扩增曲线（无规则的噪音线）最高点，分析得到 FAM 荧光信号的 Ct 值。当 FAM 荧光信号的扩增曲线为光滑的“S”形，且 Ct 值<35，提示 Septin9 基因甲基化阳性。如果无 Ct 值或 Ct 值≥35，提示 Septin9 基因甲基化阴性或甲基化程度低于最低检出限。
- 对质控品进行检测，质控品中 FAM 信号的 Ct 值小于 35 且均有明显的 S 型曲线。

【检验方法的局限性】

- 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据，为达到诊断目的，此检查结果要与临床检查、病史和其它检查结果结合使用。
- 阴性结果不能完全排除靶基因甲基化 DNA 的存在，样本中游离 DNA 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。
- 本试剂盒仅用于检测经亚硫酸盐修饰后的 DNA，修饰试验过程中，不当操作可能会导致修饰不完全或修饰过度，均有可能导致假阴性或假阳性结果。
- 不合理的样本采集、转运及处理，以及不当的试验操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。

【产品性能指标】

- 外观
 - 各组分应齐全、完整，液体无渗漏；包装标签应清晰，易识别。
- 阳性参考品符合率
 - 检测 5 份阳性参考品，检测位点均应为阳性。
 - 采用 3 种不同甲基化比例的转化效率参考品进行检测，检测位点均应为阳性。
- 阴性参考品符合率
 - 采用 5 份阴性参考品进行检测，检测位点应为阴性且内标 Ct 值≤35。
 - 采用检测范围外的 6 种参考品进行检测，检测位点应为阴性且内标 Ct 值≤35。
 - 采用其他消化道良性疾病样本进行检测，检测位点应为阴性且内标 Ct 值≤35。
 - 采用非人类基因组进行检测，检测位点应为阴性且内标 Ct 值≤35。
- 干扰物质参考品符合率
 - 采用含 4mg/dL 胆红素的肠癌样本进行检测，检测位点应为阳性。
 - 采用含 500mg/dL 甘油三酯的肠癌样本进行检测，检测位点应为阳性。
 - 采用含 10g/dL 血红蛋白的肠癌样本进行检测，检测位点应为阳性。

- 重复性
 - 对 2 份重复性参考品进行 10 次平行检测，检测位点应均为阳性且 Ct 值的变异系数（CV.%）≤5.0%。
- 最低检测限
 - 检测 16.7ng/mL 基因组背景下 10% 甲基化比例的最低检测限参考品，检测位点应为阳性。
- 质控品和阴性对照
 - 采用质控品进行检测，检测位点应为阳性。采用阴性对照进行检测，检测位点应为阴性。
- 效期稳定性
 - 取近期效期的产品检测 2~7 项，应符合相应的要求。
- 临床评价

用 DNA 甲基化测序方法和考核试剂检测标本（1026 例），Kappa 一致性分析知 Kappa 值为 1，阳性符合率为 99.71%，阴性符合率为 99.85%，总符合率为 99.81%。因此，考核试剂与对比试验方法检测结果一致，无统计学差异，两种方法等效。

以大肠癌临床诊断金标准为参照，临床诊断显示结直肠癌有 290 例，其中考核试剂检测结果与临床诊断一致的有 198 例，不一致的有 92 例，灵敏度为 68.28%；非相关疾病组（结直肠腺癌及其他增生性肠道疾病、其他恶性肿瘤、健康人群）有 485 例，其中考核试剂检测结果与临床诊断一致的有 456 例，阳性的有 29 例，

特异度为 94.02%。非相关疾病组：①腺瘤 25 例，其中考核试剂检测结果与临床诊断一致的有 18 例，阳性的有 7 例，特异度为 72.00%。息肉 54 例，其中考核试剂检测结果与临床诊断一致的有 44 例，阳性的有 10 例，特异度为 81.48%。肠道其他良性结直肠疾病 44 例，其中考核试剂检测结果与临床诊断一致的有 41 例，阳性的有 3 例，特异度为 94.00%。②其他恶性肿瘤：有 290 例，其中考核试剂检测结果与临床诊断一致的有 281 例，阳性的有 9 例，特异度为 96.90%；③健康人群：有 72 例，其中考核试剂检测结果与临床诊断一致的有 72 例，阳性的有 0 例，特异度为 100%。结直肠癌术后患者，检测结果和结直肠癌临床诊断金标准的一致性不佳。

10. 干扰实验

500ng/3mL 高浓度 DNA 背景干扰以及外源干扰物质 600mg 氟尿嘧啶、130mg 奥沙利铂和 600mg 亚叶酸钙对本产品检测不影响，无干扰。

【注意事项】

1. 实验前请仔细阅读本使用说明书。
2. 避免在不必要的情况下冻融试剂盒中的试剂，本试剂盒需低温运输。
3. 实验过程中需进行质控。
4. 本试剂盒所用的试剂不能随意替换，以免影响检测效果。不同批号的试剂盒各成分也不可相互混用。
5. 严格区分质控品和反应试剂的使用，防止试剂的污染，导致假阳性。
6. 实验时应注意防止外源 DNA 对试剂的污染，先加样品 DNA，然后进行质控品的操作。在制备反应试剂和添加 DNA 模板时，使用带滤芯的枪头，添加不同的试剂和不同的样本时需更换枪头，并经常更换手套。
7. PCR 实验室应具有 3 个不同的分区，分别为试剂准备间、样本制备间、扩增间。3 个分区应存在压力差，试剂准备间>样本制备间>扩增间。
8. 完成实验后用 10%次氯酸或 75%酒精或紫外灯处理工作台与移液器。
9. 所有化学药品都具有潜在的危险性，只有经过培训，具有相应实验室技术的人员才能使用本试剂盒。操作时，请穿着合适的实验室工作服、并佩戴一次性手套。使用过的试剂盒为临床废弃物，应该妥善处理。

【参考文献】

- 1、McIlhatton MA, Burrows JF, Donaghy PG, et al. Genomic organization, complex splicing pattern and expression of a human septin gene on chromosome 17q25.3[J]. Oncogene, 2001;20: 5930-5939.
- 2、Scott M, Hyland PL, Mcgegor G, et al. Multimodality expression profiling shows SEPT9 to be overexpressed in a wide range of human tumours[J]. Oncogene, 2005;24(29): 4688-4700.
- 3、Lofton-Day C, Model F, Devos T, et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening[J]. Clin Chem. 2008;54(2):414-423.
- 4、Grützmann R, Molnar B, Pilarsky C, et al. Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay[J]. PLoS One. 2008;3(11):e3759.
- 5、deVos T, Tetzner R, Model F, et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer[J]. Clin Chem. 2009;55(7):1337-1346.
- 6、Toth K, Galamb O, Spisak S, et al. The influence of methylated septin9 gene on RNA and protein level in colorectal cancer[J]. Medicine, 2011;17(3):503-509.

【基本信息】

注册人名称：上海透景生命科技股份有限公司
住所：中国（上海）自由贸易试验区碧波路 572 弄 115 号 1 幢 邮编：201203
联系方式：电话：021-50800020 传真：021-50270390 网址：www.tellgen.com
售后服务单位名称：上海透景生命科技股份有限公司
联系方式：电话：021-50800020 传真：021-50270390 网址：www.tellgen.com
受托企业的名称：上海透景诊断科技有限公司
住所：中国（上海）自由贸易试验区临港新片区平达路 151 号
生产地址：上海市奉贤区平达路 151 号 邮编：201413
生产许可证编号：沪药监械生产许 20162361 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20193400316

【说明书核准及修改日期】2019.05.15、2020.04.10、2021.01.29、2022.02.28、2022.07.11、2022.09.01