

人 Twist1 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）使用说明书

【产品名称】

通用名称：人 Twist1 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

20 人份/盒、50 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测尿脱落细胞中膀胱癌相关 Twist1 基因甲基化状态。

本产品用于初诊膀胱癌的辅助诊断。

膀胱癌是世界上常见的恶性肿瘤之一，也是引起泌尿系统肿瘤患者死亡的第二大肿瘤，早期发现膀胱癌可以增加手术保留膀胱的机会并提高患者总体生存率。研究发现可以在膀胱癌组织和患者尿液中检测到膀胱癌相关 Twist1 基因存在过度甲基化，检测 Twist1 基因甲基化状态可以用于初诊膀胱癌的辅助诊断。

本试剂盒采用甲基化特异性实时荧光 PCR 法检测尿脱落细胞中膀胱癌相关 Twist1 基因的甲基化状态，是一种初诊膀胱癌辅助诊断方法。本试剂盒适用于血尿、尿频、尿急和尿痛等临床上疑似膀胱癌、临床诊断建议进行膀胱镜检查患者的辅助诊断。本产品仅作为现有诊断方法的补充和辅助，供临床医师参考。

【检验原理】

本产品包括两个步骤：

步骤 I，用试剂盒 I 将提取的基因组 DNA 进行亚硫酸氢盐转化，未发生甲基化的胞嘧啶被转化为尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶不变。

步骤 II，将亚硫酸氢盐转化的 DNA（Bis-DNA）做 PCR 扩增，试剂中含有膀胱癌相关 Twist1 基因甲基化特异性引物探针和内标基因（GAPDH）引物探针。甲基化特异性引物探针能与甲基化膀胱癌相关 Twist1 基因序列特异性结合，可以在 PCR 反应中特异地检测出甲基化序列。同时，内标基因（GAPDH）可监控每个样本的提取及 PCR 反应管的扩增情况，从而避免假阴性或部分抑制结果的发生。另外，试剂盒还提供了阳性对照品和阴性对照品，需在每一次检测中同时加入。

【主要组成成分】

试剂盒 I：亚硫酸氢盐转化试剂盒（离心柱型）

组分	主要成分	体积	
		20 人份	50 人份
1. 转化液	亚硫酸氢钠	2 管	5 管
2. 缓冲液	NaOH	520μL	1.3mL
3. 结合液	异硫氰酸胍	8mL	20mL
4. 漂洗液	纯化水	2.4mL	6mL
5. 脱碘液	NaOH	4mL	10mL
6. 洗脱液	Tris-HCl、EDTA	600μL	1.5mL
7. 吸附柱	硅胶膜	20 个	50 个
8. 收集管	/	20 个	50 个

试剂盒 II：PCR 扩增试剂盒

试剂组分	主要成分	体积	
		20 人份	50 人份
1. PCR MIX	dNTP、10×PCR Buffer、DNA 聚合酶	200μL	500μL
2. 引物探针混合液	目的基因及内标基因(GAPDH)的引物和探针	100μL	250μL
3. 阴性对照品	白细胞 DNA 和 1×TE Buffer	60μL	100μL
4. 阳性对照品	膀胱癌组织 DNA 和 1×TE Buffer	60μL	100μL

注：不同批号的试剂盒中各组分不可以互换使用

其它需要自备的试剂及耗材如下：

- 核酸提取或纯化试剂（通用型）：备案号皖芜械备 20190002、货号 GE50 或 GE100；
- 无水乙醇（分析纯，浓度高于 99.5%）、异丙醇；
- 1.5mL、2mL 收集管；带滤芯枪头，包括 100μL、200μL、1mL；八联管或 96 孔板。

【储存条件及有效期】

1. 本试剂盒 I 常温储存；试剂盒 II 置于-20℃±5℃储存，有效期为 6 个月。
2. 开封后 24 小时内可在 2℃～8℃储存，避免反复冻融 5 次以上。
3. 试剂盒 I 常温运输，试剂盒 II 采用泡沫箱加干冰密封运输、运输时间不超过 4 天、开箱温度不高于-15℃。

【适用仪器】

有 FAM 和 CY5 荧光通道的荧光定量 PCR 仪：ABI 7500。

【样本要求】

尿脱落细胞的采集和存储：

留取尿样于尿样本采集管内，尿量体积为 100-200mL。尿样采集后常温下保存不超过 24 小时，2～8℃保存不超过 48 小时，可离心制备尿细胞沉淀。细胞沉淀-20±5℃可以保存一个月；-70℃及以下可以保存 12 个月。

【检验方法】

1. 核酸提取

使用安徽达健医学科技有限公司生产的核酸提取或纯化试剂（通用型）（医疗器

械备案凭证编号：皖芜械备 20190002），操作流程见试剂盒说明书，操作步骤摘要如下：

- 1.1 取 15μL 阴性对照品、阳性对照品及尿细胞沉淀，分别加入 500μL 裂解液（如有沉淀 50℃水浴溶解），30μL 蛋白酶 K，充分混匀后 70℃裂解 40min。
- 1.2 短暂离心，加入 200μL 异丙醇，充分混匀。
- 1.3 短暂离心，将 1.2 液体全部加入吸附柱中，12000rpm 离心 1min，弃废液。
- 1.4 向吸附柱中加入 600μL 漂洗液 I 一次，12000rpm 离心 30s，弃废液。
- 1.5 向吸附柱中加入 600μL 漂洗液 II 进行两次洗脱，12000rpm 离心 30s，弃废液。
- 1.6 向吸附柱中加入洗脱液 50-100μL，室温静置 3min，然后 12000rpm 离心 2min，收集 DNA。

注：提取的核酸不适合用核酸微量测定仪的结果及 OD260/OD280 来判定核酸质量，尿脱落细胞 DNA 样本于-20±5℃储存不超过 30 天。

2. 工作液的制备（在试剂准备区进行）

2.1 20 测试漂洗液的制备

将 9.6mL 无水乙醇加入到漂洗液瓶中，旋紧瓶盖，上下颠倒 5 次，彻底混匀。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“√”。

2.2 50 测试漂洗液的制备

将 24mL 无水乙醇加入到漂洗液瓶中，旋紧瓶盖，上下颠倒 5 次，彻底混匀。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“√”。

2.3 转化液的配制

首先将转化液离心 30s，然后添加 750μL 纯化水和 210μL 缓冲液到转化液中，室温下涡旋振荡 10min，使其充分溶解。制备好的转化液对光很敏感，所以尽量减少在光下的暴露，一管转化液为 10 测试用量，转化液应当在制备后立刻使用，-20±5℃条件下不超过 7 天。冷冻保存后的转化液，使用前常温下充分溶解振荡离心后使用。

3. 亚硫酸氢盐转化（在样本处理区进行）

- 3.1 预先打开金属浴，37℃恒温。
- 3.2 各取 45μL 提取后的阳性对照品、阴性对照品、45μL 待测尿液 DNA 样本（若提取的 DNA 样本浓度高于 45ng/μL，用纯化水稀释至 45ng/μL，使 DNA 总投入量为 2μg；低于 45ng/μL 样本取 45μL 参与转化）于新的 1.5mL 离心管中。
- 3.3 每管加入 5μL 缓冲液于步骤 3.2 中的 1.5mL 离心管中，配置成 50μL 体系涡旋混匀样本，短暂离心。
- 3.4 将 3.3 步骤样本置于金属浴 37℃恒温孵育 15min。
- 3.5 孵育完成后，向每个样本中加入 100μL 预先制备的转化液，混匀并短暂离心。
- 3.6 将 3.5 步骤样本置于金属浴，50℃避光孵育 12~16 小时。
- 3.7 样本置于冰上（0~4℃）孵育 10min。
- 3.8 将吸附柱置于收集管中，向吸附柱中加入 400μL 结合液。
- 3.9 将步骤 3.7 中的样本加入吸附柱中（含有结合液），盖紧管盖上下颠倒混匀数次。
- 3.10 全速离心 30s，弃废液。
- 3.11 向吸附柱中加入 100μL 漂洗液，全速离心 30s，弃废液。
- 3.12 向吸附柱中加入 200μL 脱碘液，室温（20℃～30℃）孵育 15～20min，之后全速离心 30s，弃废液。
- 3.13 向吸附柱中加入 200μL 漂洗液，全速离心 30s。重复加入 200μL 漂洗液，全速离心 1min，弃废液及收集管。
- 3.14 将吸附柱放入 1.5mL 无菌离心管中，向吸附柱的膜中间部位悬空滴加 20μL 洗脱液，洗脱转化 DNA，全速离心 1min，收集 Bis-DNA。

注：获取的 Bis-DNA 应立即用于后续实验，或者-20±5℃保存不超过 3 天。

4. PCR 设置

4.1 PCR 扩增试剂准备（在试剂准备区进行）

- 从冰箱中取出试剂盒，室温下解冻。待完全融化，充分混匀后离心备用。
- 按照下列表格配置 PCR 反应液（每次反应需要设置阳性对照品和阴性对照品）。

试剂成分	用量/人份（μL）
PCR MIX	10
引物探针混合液	5
总量/测试	15

- PCR 反应液充分混匀后，以每管 15μL 分装于 PCR 八联管（八联管做好标记），转移至样本处理区。剩余试剂放回-20±5℃保存。

4.2 加样（在样本处理区进行）

- 取 5μL 阳性对照品、阴性对照品以及待检样本的 Bis-DNA，分别加入到分装好的 PCR 八联管中。八联管盖紧管盖，短暂离心，将管壁液体离心至管底。

5. PCR 扩增（在 PCR 扩增检测区进行）

- 将 PCR 八联管放置在仪器样本槽相应位置，并记录摆放顺序。
- 仪器检测通道选择：Reporter Dye1 (Twist1 基因)：FAM，Quencher Dye1：none；Reporter Dye2(GAPDH 基因)：CY5，Quencher Dye2：none；Passive Reference：none。
- 对应检测孔的设置：在扩增反应开始前，将待检样本和对对照品设定为

“Unknown”。

● 设置 PCR 反应条件

荧光程序	温度(°C)	时间	循环数	荧光信号收集
第一步	95	5 min	1	否
第二步	95	15 s	20	否
	64	30 s		否
第三步	95	10 s	35	否
	61	31 s		是

【阳性判断值】

Twist1	ΔCt	样本检测结果
Ct≤20	ΔCt≤10	阳性
	ΔCt>10	阴性
Ct>20	/	阴性

本产品阳性判断值的研究采用临床来源尿液样本。阳性判断值研究入组（包括建立和验证）有效样本数共计 164 例，样本来源包括膀胱癌患者、肾细胞癌患者、前列腺癌患者、输尿管癌患者、肾盂癌患者、输尿管炎、尿路上皮增生、膀胱无病变人群等。

采用百分位数法确定内标基因的 Ct 值的范围，内标基因 Ct 值≤25 时判定样本合格。采用 ROC 曲线法和约登指数确定试剂盒阳性判断值为 10。当 ΔCt 值≤10 时判断为阳性，ΔCt 值>10 时判断为阴性。

注：ΔCt 值（目的基因 Ct 值-内标基因 Ct 值）

【检测结果的解释】

1. 阈值设定

可按仪器自动输出，也可根据仪器的使用说明手动调整基线，将阈值设定在荧光值对数图的线性部分，从软件中导出数据并读取 Ct 值，若基因无扩增时，Ct 值定义为 35。

2. 试剂盒有效性判定

- 阴性对照品：FAM 通道检测不应有曲线升起，CY5 通道检测有扩增且 Ct 值≤25。
- 阳性对照品：FAM 单独有扩增，或者 FAM 和 CY5 通道检测均有扩增（呈典型的 S 型曲线）且 Ct 值≤25。

★同时符合以上两个条件，此次检测视为有效。

3. 样本有效性判定

若内标基因检测（CY5 通道）有扩增且 Ct 值≤25，则可继续分析；若内标基因检测（CY5 通道）Ct 值>25 或无扩增，但目的基因（FAM 通道）有扩增且 Ct 值≤25，则可继续分析；若内标基因检测（CY5 通道）Ct 值>25 或无扩增，目的基因（FAM 通道）也无扩增或有扩增但 Ct 值>25，则无法继续分析，需重复检测。

4. 甲基化检测结果的判定

- 4.1 若样本目的基因 Twist1 基因（FAM 通道）有扩增（呈典型的 S 型曲线），Ct 值≤20，且 ΔCt 值（目的基因 Ct 值-内标基因 Ct 值）≤10，则判定该样本 Twist1 基因检测结果为阳性；若 ΔCt 值>10，则判定该样本 Twist1 基因检测结果为阴性。
- 4.2 若样本目的基因 Twist1 基因（FAM 通道）有扩增（呈典型的 S 型曲线），Ct 值>20，ΔCt 值（目的基因 Ct 值-内标基因 Ct 值）不论大小，均判定该样本 Twist1 基因检测结果为阴性。
- 4.3 若内标基因检测（CY5 通道）Ct 值>25 或无扩增，目的基因（FAM 通道）也无扩增或有扩增但 Ct 值>25，需重复检测。重复检测判定标准同 4.1 和 4.2 项。若重复检测内标基因检测（CY5 通道）Ct 值>25 或无扩增，需要重新采集样本检测。

【检测方法的局限性】

1. 两个试剂盒需联合使用，以确保检测有效性。
2. 由于膀胱癌检测依赖于样本中肿瘤 DNA 的量，所以可能受样本收集过程、样本储存方式、病人个体因素（如年龄，其它疾病）以及肿瘤级别影响，样本的采集、制备和存储均应按照要求进行，否则将影响检查结果，导致假阴性的检测结果。
3. 本检测试剂盒检测结果仅供临床参考，不作为确诊膀胱癌的诊断证据，任何受检样本 Twist1 基因检测呈阳性的患者还应接受膀胱镜的进一步检查确诊。
4. 由于上尿路肿瘤与膀胱癌的组织同源性高，试剂盒临床试验对上尿路肿瘤（肾盂癌和输尿管癌）有一定的检出率（50.9%），本产品检测结果为阳性且通过膀胱镜检查显示膀胱无病变的受检者，建议通过其它临床检查手段排查上尿路肿瘤。

【产品性能指标】

1. 产品性能指标

1.1 阳性符合率

检测 3 份企业阳性参考品，结果均为阳性。

1.2 阴性符合率

检测 4 份企业阴性参考品，结果均为阴性。

1.3 最低检出限

1.3.1 检测 3 份企业检出限参考品，检出限参考品应能检出。

1.3.2 使用临床阴性尿液样本为背景基质，对临床膀胱癌患者尿液样本进行不同梯度稀释，进行最低检出限研究，结果表明本试剂盒最低可以检出核酸浓度为 5ng/μL、甲基化比例为 5% 的临床阳性样本。

1.4 精密度

1.4.1 检测 1 份企业阴性精密度参考品，10 次重复，结果全部为阴性。

1.4.2 检测 1 份企业弱阳性精密度参考品，10 次重复，结果全部为阳性。

1.4.3 检测 1 份企业中阳性精密度参考品，10 次重复，结果全部为阳性，计算所测得 Twist1 基因 Ct 值的变异系数（CV），均不高于 5%。

1.4.4 使用精密度参考品分别对三批试剂盒在 ABI7500 荧光 PCR 仪上由两位实验人员在不同的实验室进行连续 20 天的检测，结果显示在日内、日间、人员间、设备间、实验室间和批间实验结果均符合要求，且中阳性参考品 Twist1 基因 Ct 值的变异系数（CV）小于 5%。

2. 其它干扰

干扰实验显示，样本中含有以下干扰物：尿酸（1.4mmol/L）、葡萄糖（55mmol/L）、抗坏血酸（170μmol/L）、白蛋白（60g/L）、酮体（12mmol/L）、尿胆原（10.65μmol/L）、亚硝酸盐（120mg/L）、pH 为 8.0、氨（107μmol/L）、甘油三酯（37mmol/L）、血红素（2g/L）、维生素 C（170μmol/L）、常用药物如盐酸左氧氟沙星（1.08g/L）、四环素（780mg/L）、青霉素（27g/L）、头孢克肟（426.6mg/L）、布洛芬胶囊（478.8mg/L）、感冒灵胶囊（9g/L）对检测结果无影响。膀胱癌常用灌注治疗药物卡介苗（360mg/L）、丝裂霉素（120 mg/L）、表柔比星（150mg/L）会影响检测的敏感性，因此接受化疗药物治疗后 1 个月内勿留样检测。

3. 交叉反应

试剂盒检测转化前的尿液样本、非目标的其它基因甲基阳性的尿液样本、常见尿道微生物样本及尿道相关良性病变，均无交叉反应；试剂盒检测其它恶性肿瘤患者尿液样本（肾细胞癌、前列腺癌、肝癌、胃癌、输尿管癌、肾盂癌），结果显示：该产品与输尿管癌和肾盂癌存在一定的交叉反应，与其它恶性肿瘤无交叉反应。

4. 准确性

选择 138 例样本进行准确性研究，得出阳性符合率为 100%，阴性符合率为 96.67%，符合率为 97.83%。根据临床疾病的类型分为膀胱癌组、正常人组、干扰组和上尿路肿瘤组，一致性分别为：97.30%、100%、96.08%和 100%。

5. 临床有效性

通过三家临床机构共纳入 1233 例临床有效样本的验证，本试剂盒对膀胱癌检测的灵敏度为 88.2%、特异性为 86.8%，总符合率为 87.2%。

【注意事项】

1. 实验室注意事项

- （1）应避免实验过程中的交叉污染，包括 DNA 提取，亚硫酸氢盐转化和 DNA 洗涤等过程。
- （2）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枪头，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 提取和荧光定量 PCR 分析的专业实验人员完成。
- （3）为防止 PCR 扩增产物的污染，建议严格区分 PCR 步骤，分为 DNA 的提取及转化、PCR 试剂的配置和荧光定量 PCR 扩增。

2. 微生物及感染状态

为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样本应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和黏膜；样本的处理建议在可防止气雾外流的生物安全柜中操作，样本制备区所用过的试管、吸头需打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃；样本操作和处理均需符合相关法规要求：卫生部《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

【参考文献】

1. 国家药品监督管理局.《体外诊断试剂说明书编写指导原则》（2014 年第 17 号公告）
2. Miremami J, Kyprianou N. The Promise of Novel Molecular Markers in Bladder Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014; 15(12):23897-23908
3. Yafi FA, Brimo F, Steinberg J, Aprikian AG, Tanguay S, Kassouf W. Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urol Oncol*. 2015 Feb;33(2):66.e25-31.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：安徽达健医学科技有限公司
住所/生产地址：芜湖经济技术开发区东区 9# 厂房（中科芜湖科技园公司内）
联系电话：4001168936
传真：0553-2663661
售后服务单位名称：广州达健生物科技有限公司
E-mail: ts@targene.cn 网址: http://www.targene.cn
生产许可证编号：皖食药监械生产许20220021号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20223401301

【说明书核准及修改日期】2022 年 10 月 14 日核准