

人 SDC2、NPY、FGF5、PDX1 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 SDC2、NPY、FGF5、PDX1 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】

本产品用于体外定性检测人粪便脱落细胞中 SDC2、NPY、FGF5、PDX1 4 种基因甲基化状态。

本产品适用于结直肠癌高危、临床诊断需要进行结肠镜检查但因患者结肠镜依从性差或其他医学原因无法做结肠镜检查患者的辅助诊断。检测结果不作为肠癌早期诊断或确诊的依据且不能替代结肠镜检查，仅作为辅助诊断供临床医师参考。不能用于普通人群的肿瘤筛查。

SDC2（黏蛋白多糖 2）是一种膜蛋白，参与细胞增殖、细胞迁移、与细胞外基质蛋白相互作用等，其甲基化被多项研究表明与结直肠癌的发生密切相关。PDX1（胰十二指肠同源盒蛋白 1）是胚胎消化道发育分化和维持胰岛功能的关键转录因子。FGF5（纤维原细胞生长因子 5）是一种生长因子，广泛促进中胚层和神经外胚层细胞的生长和分化，也被发现可以致癌并在多种肿瘤细胞株中表达。NPY（神经肽 Y）属于神经肽家族，是中枢神经系统分布最丰富的神经递质及血管收缩素，与 G 蛋白偶联受体结合参与细胞生长、粘附及血管生成等。本产品检测 SDC2、NPY、FGF5、PDX1 4 种基因的甲基化状态可以通过 DNA 的特异扩增而被检测到。研究发现，在大肠癌患者中，SDC2、NPY、FGF5、PDX1 4 种基因呈高甲基化状态。

【检验原理】

本产品包括以下两个步骤：
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，将步骤 I 中亚硫酸氢盐转化后的 DNA（Bis-DNA）用试剂盒 II 进行多重荧光定量 PCR 扩增，试剂中甲基化特异性引物探针能与甲基化后的基因 CpG 序列特异性结合，可以在 PCR 反应中特异性地检测出甲基化 CpG 序列；内标基因（GAPDH）可监控每个样本的提取效果及 PCR 反应的扩增情况，从而有效避免假阴性或部分抑制结果的出现。另外，试剂盒中提供了阴性对照品和阳性对照品，需在每一次检测中同时检测阴性对照品和阳性对照品。

【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/数量	
		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.脱膜液	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：荧光 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	400μL	1000μL
2.引物探针混合液 I	SDC2 基因/NPY 基因/内标基因的引物和探针	100μL	250μL
3.引物探针混合液 II	PDX1 基因/FGF5 基因/内标基因的引物和探针	100μL	250μL
4.阴性对照品	正常人白细胞 DNA 和 1×TE Buffer	60μL	100μL
5.阳性对照品	肠癌细胞株 DNA 和 1×TE Buffer	60μL	100μL

注：1、不同批号的试剂盒中各组分不应互换使用。

2、本产品不包含核酸提取组分，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（离心柱型/粪便）》（备案号：皖芜械备 20220022 号，货号：ST50）提取粪便脱落细胞样本 DNA。

3、需要自备的试剂及耗材

- 无水乙醇（分析纯，浓度高于 99.5%）
- 1.5mL、2mL 收集管
- 带滤芯枪头，包括 100μL、200μL、1mL 规格
- 八联管

【储存条件及有效期】

1. 试剂盒 I 置于 15℃~25℃储存，试剂盒 II 置于-20℃±5℃储存，有效期为 6 个月。
2. 试剂盒 II 开封后在 2℃~8℃可储存 24 小时，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。
4. 生产日期及有效期至详见产品标签。

【适用仪器】

ABI 7500。

【样本要求】

采样方法：

- 1、取样前在病例信息采集卡上填写个人信息。
- 2、采集样本最好为晨便。如果无晨便，亦可用其他时间段的粪便，粪便取

样量在 1g~15g。

3、拧开 50mL 离心管盖，注意保持垂直，以防保存液倾侧。取样时，按照采样说明书取样。排便后，立即按照采集说明指引方法装入粪便样本保存管内，避免大便与小便混合。

4、将粪便样本装入 50mL 离心管中，按要求使液面升到约 35mL 处，即采样成功。

注意事项：

- 1、接便时避免尿液、纸巾、污水等非大便样本混入粪便样品中。
- 2、完成取样后确保拧紧采集管盖子，以防止外泄。
- 3、避免在肛肠疾病出血期取样；女性避免在生理期间取样。
- 4、采样前 1 个月内有服用化疗药物的受试者不宜采样。
- 5、避免采集水样便或痢疾样粪便样本。

保存条件：

常温保存不超过 24 小时；-20℃±5℃冰箱可以保存 3 个月；-70℃及以下冰箱可以保存 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（离心柱型/粪便）》（备案号：皖芜械备 20220022 号）操作流程见试剂盒说明书，简要步骤如下：

- 1.1 粪便样本使用湿匀仪进行湿匀后，4200rpm 离心 30min，取上清液为粪便脱落细胞悬液。
 - 1.2 取 1mL 粪便脱落细胞悬液，加入 100μL 脂肪酶，充分混匀后 37℃消化 20min，4000rpm 离心 10min 取上清。
 - 1.3 取 1mL 上清转移至新的离心管，加入 500μL 裂解液、60μL 蛋白酶 K，震荡混匀，70℃裂解 40 min。
 - 1.4 加入 500μL 异丙醇，充分振荡混匀后冰浴静置 10min。
 - 1.5 12000rpm 离心 1min，取上清液加入至吸附柱中，分两次将上清液加入至滤芯吸附柱中，12000rpm 离心 1-2min 直至残余液体甩干。加入 800μL 洗涤液 I，12000rpm 离心 1min，更换外套管。重复一次。
 - 1.7 加入 800μL 洗涤液 II，12000rpm 离心 1min，更换外套管。重复一次。
 - 1.8 12000rpm 室温离心 2min，将吸附柱放入 1.5mL 无菌离心管中。
 - 1.9 开盖，在抽风柜晾干 5min，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。
 - 1.10 加入 60μL 的洗脱液，室温静置 5-10min，12000rpm 离心 3min，收集 DNA。
- 注：粪便脱落细胞 DNA 在-20±5℃储存应不超过 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，在-20℃±5℃可保存一周。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 室温下解冻并混匀阳性对照品、阴性对照品和待测粪便 DNA 样本。各取 15μL 阳性对照品、阴性对照品和 45μL 待测粪便 DNA 样本（总量建议不高于 2μg）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，配制成 50μL 体系（阳性对照品及阴性对照品加入 30μL 纯化水），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 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（14000rpm）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 脱膜液，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 30s，弃废液及收集管。
- 3.14 将吸附柱放入 1.5mL 无菌离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 30μL 洗脱液，洗脱转化 DNA，全速离心 1min，收集 Bis-DNA。
- 3.15 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 反应设置

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 II，室温下解冻，待完全融化，充分混匀后离心备用。
- 按照表 1 配制 PCR 反应液 1 和 2（每次反应均需要设置阳性对照品和阴性对照品）。

表 1：PCR 反应液

PCR 反应液 1		PCR 反应液 2	
试剂成分	用量/检测次(μL)	试剂成分	用量/检测次(μL)
PCR MIX	10	PCR MIX	10
引物探针混合液 I	5	引物探针混	5

		合液 II	
总量/测试	15	总量/测试	15

● 各 PCR 反应液充分混匀后，按每管 15μL 体积分装于 PCR 八联管中，并做好标记后转移至样本处理区。

4.2 加样（在样本处理区进行）

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

5. PCR 扩增（在 PCR 扩增检测区进行）

5.1 将 PCR 八联管放置在仪器样本槽的相应位置，并记录好摆放次序。

5.2 仪器检测通道选择：Reporter Dye1 (SDC2/PDX1)：FAM，Quencher Dye1：none；Reporter Dye2 (NPY)：VIC，Quencher Dye2：none；Reporter Dye3 (FGF5)：ROX，Quencher Dye3：none；Reporter Dye4 (GAPDH)：CY5，Quencher Dye4：none；Passive Reference：none。

5.3 对应检测孔的设置：在扩增反应开始前，将待检样本和质控品设定为“Unknown”。

5.4 按表 2 设置 PCR 反应程序：

表 2：PCR 反应程序

荧光程序	温度(℃)	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
	66	30 s		否
第三步	95	10 s	40	否
	58	31 s		是

【阳性判断值】

使用人 SDC2、NPY、FGF5、PDX1 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）对临床样本进行 SDC2、NPY、FGF5、PDX1 4 基因检测，使用风险值（P 值）计算公式分析靶基因检测结果 Ct 值（保留整数），获得样本风险值（P 值），再用统计学上的约登指数来确定最合适的灵敏度和特异性所对应的 Cut-off 值，使用 ROC 法进行计算，Cut-off 值为 5.00 时诊断效能最优。即样本检测结果 P 值≥5.00 时，样本检测结果为阳性；样本检测结果 P 值<5.00 时，样本检测结果为阴性。

P 值计算公式= $11.11-0.0302*FGF5$ Ct 值- $0.0427*NPY$ Ct 值- $0.0811*PDX1$ Ct 值- $0.0571*SDC2$ 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，将阈值设置在荧光值对数图的线性部分，从软件中读取 Ct 值。若基因无扩增时，Ct 值定为 40。

2. 试剂盒有效性判定

若试剂盒对照品满足表 3 中所列标准，并且待检样本本同阴性和阳性对照在同一个 PCR 反应中测定，则该 PCR 反应被视为有效。

表 3：试剂盒有效性判定

对照品检测结果	目的基因的 Ct 值	GAPDH 的 Ct 值
阳性对照品	扩增曲线呈 S 型，Ct 值≤25	扩增曲线呈 S 型，Ct 值≤25；或者无扩增曲线
阴性对照品	无扩增曲线或扩增曲线 Ct 值>25	扩增曲线呈 S 型，Ct 值≤25

3. 样本有效性判定

若内标基因 Ct 值≤25，且扩增曲线呈 S 型，则可继续分析。若内标基因 Ct 值>25 或无扩增曲线，但目的基因 Ct 值≤20，则可继续分析（可能由于目的基因扩增对内标基因扩增产生抑制）；若内标基因 Ct 值>25 或无扩增曲线，且目的基因无扩增或有扩增但 Ct 值>20，则无法继续分析，需重复检测。

4. 样本检测结果判定

使用 P 值计算公式分析靶基因检测结果 Ct 值，获得样本检测结果的 P 值：

- （1）样本检测结果 P 值≥5.00 时，样本检测结果为阳性；
- （2）样本检测结果 P 值<5.00 时，样本检测结果为阴性。

【检测方法的局限性】

1. 本产品仅能检测使用安徽达健医学科技有限公司生产的“一次性使用粪便采集器”收集的粪便样本。

2. 本产品两组基因检测必须联合使用，以确保结果有效。

3. 该产品的使用者应该是接受过 PCR 反应技术训练的技术操作人员。

4. 由于大肠癌检测依赖于样本中肿瘤 DNA 的量，所以检测结果可能受样本收集过程、样本储存方式、病人个体因素（如年龄，其他疾病）以及肿瘤级别影响，样本的采集、制备和存储均应按要求进行，否则将影响检查结果，导致假阴性的检测结果。

5. 本产品检测结果仅供临床参考，不作为确诊结肠癌的诊断证据，任何甲基化检测呈阳性的个体还应接受全结肠镜进一步检查确诊。

【产品性能指标】

1. 产品的性能指标

1.1 阳性符合率

8 份企业阳性参考品（CRC-P1~CRC-P8）阳性符合率（+/+）为 8/8。

1.2 阴性符合率

3 份企业阴性参考品（CRC-N1~CRC-N3）阴性符合率（-/-）为 3/3，内参 GAPDH 基因扩增曲线正常。

1.3 最低检出限

1.3.1 检出限参考品（CRC-L1~CRC-L8）结果均为阳性；

1.3.2 使用临床阴性粪便样本为基质，添加不同比例的人甲基化全基因组 DNA，进行最低检出限的确认；对临床肠腺瘤、肠神经内分泌瘤、肠腺癌、息肉和腺瘤患者粪便样本进行不同梯度稀释，进行最低检出限验证，结果表明：试剂盒可在 10ng/μL 基因组背景下检测出不低于 5% 水平的 SDC2/NPY/PDX1/FGF5 基因甲基化。

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，同时内参 GAPDH 扩增曲线正常，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。计算所得 SDC2、NPY、FGF5、PDX1 4 基因 Ct 值的变异系数（CV），均应不高于 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，且中阳性参考品各靶基因 Ct 值的变异系数（CV）小于 5%。

2. 其他干扰实验

干扰实验显示，粪便样本中含有以下干扰物：胆红素（0.20mg/mL）、胆固醇（5mg/mL），食物残渣中动物 DNA（500ng/mL）、植物 DNA（500ng/mL）、植物油（10μl/ml）等，常用口服抗生素如四环素（10.65mg/ml）、青霉素（2.56mg/ml）等，常用胃药吗丁啉（0.14mg/ml）、胃药斯达舒（6.84mg/ml）、甘露醇（75mg/ml）、通便灵胶囊（7.25mg/ml）、痔疮膏（24.75mg/ml）、布洛芬胶囊 75μg/ml、奥美拉唑（2.82mg/ml）、头孢克肟（20.5mg/ml）、盐酸左氧氟沙星（0.15mg/ml）、西咪替丁（2mg/ml）以及肿瘤治疗药物去氧氟尿苷片（3μg/ml）贝伐珠单抗（2.5mg/ml）、瑞戈非尼（7.5μg/ml），对检测结果无影响。黄连素（9.23mg/ml）对检测结果有影响，因此患者取样前 1 天应注意勿服用药物黄连素。

3. 交叉反应

本产品检测转化前的粪便样本、其他甲基化基因阳性的粪便样本、常见肠道微生物 DNA 及食物 DNA、植物油、消化道相关良性病变，均未检测出交叉反应；其他恶性肿瘤粪便样本（口腔癌、食管癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、胆囊癌）均未检测出交叉反应。

4. 准确性

收集 56 例真实临床粪便脱落细胞样本进行准确性研究，分别采用本试剂盒及测序方法进行验证，其中 SDC2 基因的阳性符合率为 96.30%、阳性符合率为 100%；NPY 基因的阳性符合率为 96.43%、阳性符合率为 100%；PDX1 基因的阳性符合率为 96.43%、阳性符合率为 100%；FGF5 基因的阳性符合率和阳性符合率均为 100%。

5. 临床有效性

在 3 家临床检测机构进行临床试验，共纳入 1447 例病例，试验体外诊断试剂与临床参考标准相比，针对结肠癌患者临床灵敏度为 91.17%、非结肠癌或癌前病变患者临床特异性为 91.12%。

【注意事项】

1. 实验室注意事项

（1）应避免实验样本中的交叉污染，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 提取或转化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 试剂的配制和荧光定量 PCR 扩增。

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，不会感染人体或其他动物。待测粪便样本应视为潜在的感染源，其操作应在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感染源的影响。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. 国家食品药品监督管理总局. 关于发布体外诊断试剂说明书编写指导原则的公告（2014 年第 17 号）[EB/OL]. (2014-09-11) [2023-04-12]. <https://www.nmpa.gov.cn/ylqx/ylqxgggt/ylqxqtxg/20140911120001763.html>.
2. Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2016, 66(2): 115-132.
3. Saito Y, Emura F, Matsuda T, et al. A new sinker-assisted endoscopic sub-mucosal dissection for colorectal cancer [J]. Gastrointestinal endoscopy, 2005, 62(2): 297-301.
4. Mandel JS, Bond JH, Church TR, et al. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood [J]. New England Journal of Medicine, 1993, 328(19): 1365-1371.
5. Levin B, Brooks D, Smith RA, et al. Emerging technologies in screening for colorectal cancer: Ct colonography, immunochemical fecal occult blood tests, and stool screening using molecular markers [J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2003, 53(1): 44-55.
6. Walsh JME, Terdiman JP. Colorectal cancer screening: clinical applications [J]. JAMA, 2003, 289(10): 1297-1302.
7. Walsh JME, Terdiman JP. Colorectal cancer screening: scientific review [J]. Jama, 2003, 289(10): 1288-1296.
8. Church TR. Offering patient's colorectal cancer screening [J]. Journal of the National Cancer Institute, 2005, 97(5): 328-329.
9. Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas [J]. New England Journal of Medicine, 1992, 326(10): 658-662.

【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）

联系方式：020-39341032

传真：0553-2663661

售后服务单位名称：广州达健生物科技有限公司

生产许可证编号：皖药监械生产许 20220021 号

E-mail: targene@targene.cn 网址: <http://www.gz-targene.cn>

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20233400970

【说明书核准日期及修改日期】2023 年 7 月 21 日核准