

人类 SDC2 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 SDC2 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

10 人份/盒，90 人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人类便样本中 SDC2 基因的甲基化情况。

本试剂盒适用于临床医生建议做肠镜检查的患者的辅助诊断，不能作为肿瘤早期诊断或确诊的依据，仅作为辅助诊断供临床医生参考，提供给患者更多一种无创性大肠癌辅助诊断方法的选择。临床医生应结合患者病情及其他实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

DNA 异常的高度甲基化与癌症的发生发展相关，有研究分析了大肠癌患者的癌组织以及癌旁组织的甲基化情况，筛选出具有显著差异的甲基化 SDC2 基因^[1]。在粪便样本的 SDC2 基因甲基化的研究中发现，在特异性为 90.9% 时，大肠癌的检测敏感性为 90.0%^[2]。相对于正常组织，SDC2 基因在大肠癌和腺瘤组织中呈现高水平的甲基化现象，并且 SDC2 基因在大肠癌和腺瘤组织中的表达也显著高于正常组织^[3]。SDC2 基因在大肠癌不同分期中呈现高度的甲基化，这一现象预示着其作为大肠癌诊断标志物具有较高的价值^[1-3]。

【检验原理】

本试剂盒主要包含提取转化和荧光 PCR 两个步骤：提取转化步骤是用磁珠捕获的方法提取人类便样本中的 SDC2 基因和 ACTB(β-actin)基因；然后用亚硫酸盐进行转化未发生甲基化的 DNA，发生甲基化的 SDC2 基因则不会被亚硫酸盐转化。

荧光 PCR 步骤是通过使用双重荧光 PCR 的方法在同一个反应孔中检测甲基化的 SDC2 基因及 ACTB 基因保守序列。通过特异性的引物来扩增甲基化的 SDC2 基因，由 FAM 标记的荧光探针报告扩增信号，甲基化的 SDC2 基因作为大肠癌诊断的标志物；通过设计保守区域的引物来扩增 ACTB 基因，由 Texas Red 标记的荧光探针报告扩增信号。ACTB 基因作为内控基因用来评估样品 DNA 是否足量以及样品 DNA 质量是否合格。试剂盒中提供阳性质控品、阴性质控品，在每次检测反应中都需要同时检测。

【主要组成成分】

1. 试剂盒中包含的试剂组份

本试剂盒根据试剂不同的保存条件要求，分成如下三个试剂盒：

表 1：试剂盒组成、规格及主要成分

组分		包装规格		主要成分
		10 人份/盒	90 人份/盒	
试剂盒 I	1. SPE 柱	10 支	90 支	SPE 柱
	2. 裂解液	31 ml ×1 瓶	207 ml ×1 瓶	异硫氰酸胍溶液
	3. 洗液 W1	13 ml ×1 瓶	85 ml ×1 瓶	MOPS 缓冲液
	4. 洗液 W2	4 ml ×1 瓶	25 ml ×1 瓶	Tris-HCl 溶液
	5. 溶液 A	0.8 ml ×1 管	5.3 ml ×1 瓶	NaOH 溶液
	6. 结合液	7 ml ×1 瓶	48 ml ×1 瓶	盐酸胍溶液
	7. 磁珠 M2	770 μl ×1 管	5.3 ml ×1 瓶	磁珠
	8. 溶液 C	700 μl ×瓶	4.3 ml ×瓶	NaOH 溶液
试剂盒 II	1. 磁珠 M1	770 μl ×1 管	5.3 ml ×1 瓶	磁珠
	2. 溶液 B	1.8 ml ×1 管	1.8 ml ×6 管	亚硫酸盐
试剂盒 III	1. 洗脱液	1 ml ×1 管	6.4 ml ×1 瓶	tRNA 溶液
	2. PCR 反应液 1	180 μl ×1 管	1080 μl ×1 管	DNA 聚合酶、dNTPs、5×PCR Buffer
	3. PCR 反应液 2	180 μl ×1 管	1080 μl ×1 管	MgCl ₂ 、SDC2 基因和 ACTB 基因上下游引物 4 条、SDC2 基因和 ACTB 基因探针 2 条
	4. 阴性质控品	3.1 ml ×2 瓶	3.1 ml ×2 瓶	Caco2 细胞 DNA
	5. 阳性质控品	3.1 ml ×2 瓶	3.1 ml ×2 瓶	Hct116 细胞 DNA

注：不同批号试剂盒中的各组分不可以互换。

2. 产品不包含，需自备的试剂和仪器

仪 器 类：台式离心机、水浴锅、磁力架、移液器（规格：10 μl、100 μl、1000 μl、5 ml）

试剂耗材类：实验需要但试剂盒中不包含的有无水乙醇、10 ml 离心管、带滤芯枪头（规格：10 μl、100 μl、1000 μl、5 ml）、2 ml 离心管、8 联管或者 96 孔板、96 孔板封口膜及压膜器。

【储存条件及有效期】

试剂盒 I 常温储存；试剂盒 II 需 2℃-8℃密封储存；试剂盒 III 需-20℃±5℃密封储存。试剂盒有效期为 12 个月。

试剂盒III反复冻融不超过 4 次，打开包装后 1 周内可在 2℃-8℃储存，长期储存请放置于-20℃±5℃（建议开封后即分装）。试剂盒 II、试剂盒III运输过程中需要保持合适温度，运输时间不超过 6 天。

【适用仪器】

Roche LightCycler 480 II、ABI 7500。

注意：

1. 使用 ABI 7500 仪器检测时探针模式的设置，报告基因：FAM、Texas Red；猝灭基团：NONE；参比荧光：NONE。反应体积为 30 μl。

2. 使用 Roche LightCycler 480 II 仪器检测时需要选择荧光通道：FAM（465-510nm）、Texas Red（533-610nm）。反应体积 30 μl。

【样本要求】

1. 检测样本类型：粪便样本，取样量在 1.5g~10g 之间。
2. 患者提供的粪便样本必须使用广州市康立明生物科技有限责任公司生产的粪便采集装置收集，3 天内寄送至检测机构。
3. 检测机构在收到样本后建议立刻进行 DNA 的提取及亚硫酸盐的处理、荧光 PCR 的检测，否则建议将含有样本保存液的粪便样本振荡混匀，冻于-80℃±5℃冰箱，保存期不超过 6 个月。
4. 本试剂盒提取和亚硫酸盐处理的 DNA 不适于测定 OD₂₆₀ 来定量；不适于通过 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 来判断样本质量。
5. 提取和亚硫酸盐处理完的 DNA 建议立即检测，否则请于-20℃以下保存，保存时间不要超过 1 个月。

【检验方法】

1. 核酸提取及转化工作液的准备

1.1 90 人份工作液的准备

1.1.1 洗液 W2 的准备

* 将 100 ml 无水乙醇加入洗液 W2 中，盖好盖后上下颠倒 6 次混匀。在标签的侧面“已加入无水乙醇”的方框“□”内标记“√”号。

1.1.2 溶液 C 的准备

* 将 17 ml 无水乙醇加入溶液 C 中，盖好盖后上下颠倒 6 次混匀。在标签的侧面“已加入无水乙醇”的方框“□”内标记“√”号。（注意：该试剂要现配现用，溶液 C 与无水乙醇的体积比例是 1：4）

1.2 10 人份工作液的准备

1.2.1 洗液 W2 的准备

* 将 16 ml 无水乙醇加入洗液 W2 中，盖好盖后上下颠倒 6 次混匀。在标签的侧面“已加入无水乙醇”的方框“□”内标记“√”号。

1.2.2 溶液 C 的准备

* 将 2.8 ml 无水乙醇加入溶液 C 中，盖好盖后上下颠倒 6 次混匀。在标签的侧面“已加入无水乙醇”的方框“□”内标记“√”号。（注意：该试剂要现配现用，溶液 C 与无水乙醇的体积比例是 1：4）

2. 粪便核酸提取及转化

2.1 粪便样本、阴性质控品以及阳性质控品的融化

* 分别将 1 份阴性质控品、1 份阳性质控品和待检测的粪便样本置于 2~8℃过夜解冻，取出样本管，擦去管外壁水珠将粪便样本混合均匀。（注意：样品解冻后，应立即进行下一步操作）

2.2 离心

* 将粪便样本 5000 rpm 离心 10 分钟。

* 取 9ml 上清转移至新的 10 ml 离心管中，5000 rpm 离心 10 分钟。

2.3 过柱

* 取 3.2 ml 离心后的悬浮液加入到 SPE 柱中，5000 rpm 离心 5 分钟。（剩余的上清可置于-80±5℃保存）

2.4 弃柱

* 弃 SPE 柱内柱。

* 将解冻的阴性质控品、阳性质控品各 3 ml 分别加到新的 10 ml 离心管中。

2.5 裂解

* 在样本、阴性质控品、阳性质控品中分别加入裂解液 2 ml，同时加入磁珠 M1 50 μl，盖好盖后振荡混匀。（注意：磁珠 M1 加入前请振荡混匀，观察管底无明显的沉淀物后再加入；磁珠 M1 与磁珠 M2 不能混用。）

2.6 孵育

* 将离心管放置在干浴器上，95℃孵育 15 分钟后取出离心管快速摇匀，室温（20℃~30℃）条件下静置 1 小时。（注意：离心管静置时应自然降温，避免快速降温的因素。）

2.7 转移

* 1500 rpm 离心 10sec 后将离心管置于磁力架 5 分钟，吸弃 4.2 ml 液体，将剩余液体以及磁珠转移至新的 2 ml 离心管中。

* 将离心管涡旋振荡至肉眼无可见的磁珠团块，简短离心后将离心管置于磁力架 1-3 分钟，吸弃液体。（注意：涡旋振荡效果影响实验的结果，应使磁珠充分分散。）

2.8 第一次洗涤

* 加入 800 μl 洗液 W1，涡旋振荡至肉眼无可见的磁珠团块后简短离心，将离心管置于干浴器中室温 1300 rpm 振荡孵育 1 分钟，简短离心后将离心管置于磁力架 1-3 分钟，吸弃液体。（注意：涡旋振荡效果影响实验的结果，应使磁珠充分分散；洗液 W1 与洗液 W2 不能混用）

2.9 转化

* 加入 50 μl 溶液 A 涡旋振荡将管壁磁珠洗下来，简短离心室温 1300 rpm 振荡 20 分钟，简短离心；将离心管置于磁力架 1-3 分钟，使用移液器转移溶液至新的离心管。
* 加入 100 μl 溶液 B，混匀后简短离心，干浴器 65℃孵育 70 分钟后简短离心。

2.10 纯化

* 加入 450 μl 结合液以及 50 μl 磁珠 M2，室温 1300 rpm 振荡孵育 15 分钟，简短离心置于磁力架 1 分钟，吸弃液体；再次简短离心置于磁力架 1 分钟，吸弃液体。（注意：磁珠 M2 加入前请振荡混匀，观察管底无明显的沉淀物后再加入；磁珠 M2 与磁珠 M1 不能混用。）

2.11 第二次洗涤

* 加入 800 μl 洗液 W2，使用移液器轻轻吹散磁珠，将磁珠转移至一个新的 2ml 离心管中。室温干浴器 1300 rpm 振荡混匀 1 分钟后简短离心，置于磁力架 1 分钟，吸弃液体。

2.12 脱磷酸基团

* 加入 200 μl 已经加入无水乙醇的溶液 C 室温 1300 rpm 振荡孵育 15 分钟，简短离心置于磁力架 1 分钟，吸弃液体。

2.13 第三次洗涤

* 加入 200 μl 洗液 W2，室温干浴器 1300 rpm 振荡混匀 1 分钟后置于磁力架 1 分钟，

简短离心，吸弃液体。

2.14 第四次洗涤

* 加入 200 μl 洗液 W2，室温干浴器 1300 rpm 振荡混匀 1 分钟后简短离心，置于磁力架 1 分钟，吸弃液体。

2.15 干燥

* 打开离心管室温干燥 10 分钟。（注意：不要增加干燥温度和干燥时间，不需要振荡）

2.16 洗脱

* 将洗脱液放置在冰盒上自然融化，加入 60 μl 洗脱液，干浴器 65℃，1300 rpm 孵育 10 分钟，简短离心置于磁力架上 1 分钟，将洗脱下来的溶液转移至新的离心管中，盖好管盖并且标记。

3. 扩增试剂准备（PCR 反应液配置区）

3.1 将 PCR 反应液 1 以及 PCR 反应液 2 插入冰盒中，自然融化。

3.2 按照以下反应体系加入各种成分。

表 2: PCR 反应加样方式

PCR 反应液 1	PCR 反应液 2	模板
10 μl	10 μl	10 μl
总体积: 30 μl		

3.3 加样完成后，充分混匀后离心，将 PCR 管放入 PCR 仪中。

3.4 按照下面步骤设置 PCR 的反应条件（下表）：

表 3: PCR 反应程序

变性	48 次循环	冷却
95 °C 5 min	(1) 95°C/15 sec (2) 58°C /30 sec (3) 72°C /30 sec (末端检测 FAM, Texas Red)	40°C/ 30 sec

3.5 分析条件设置: Roche LightCycler 480 II 仪器结果分析时使用 Abs Quant/2nd Derivative Max 分析方法分析扩增的循环数; ABI 7500 仪器结果分析时使用仪器默认基线, SDS V2.3.1 软件分析时, FAM 通道 (检测 SDC2 基因) 值设置为 65000, Texas Red 通道 (检测 ACTB 基因) 阈值设置为 95000. FAM 通道和 Texas Red 通道扩增曲线呈现 “S” 型扩增才可计算 Ct 值。

【阳性判断值】

本试剂盒检测临床样本，得到 465 例有效数据中结直肠癌患者 120 例、腺瘤（ $\geq 10\text{mm}$ ）76 例、肠息肉样本（ $< 10\text{mm}$ ）31 例、肠炎样本 24 例、胃炎样本 6 例、胃癌样本 18 例、胃息肉样本 1 例、神经内分泌瘤样本 3 例、肝癌和肠道脂肪瘤样本各 1 例、正常人 184 例。样本的 ACTB 基因的 Ct 值在 22 至 40 之间，取 95% 分位值，Ct 值 ≤ 36 时判定为样本质量合格。在阳性判断值的选择时根据到临床的需要，在样本质量合格的条件下选择 SDC2 基因 Ct 值 ≤ 38 为阳性结果；SDC2 基因 Ct 值 > 38 时为阴性结果。

检测结果显示在检测特异性为 92.2% 时（248/269）结直肠癌患者的检测灵敏度为 82.25%（99/120），腺瘤患者的检测灵敏度为 47.4%（36/76）。31 例息肉样本检测结果为 4 例阳性 27 例阴性。肠炎患者样本 24 例检测结果为 1 例阳性 23 例阴性；胃炎疾病患者样本 6 例检测结果为阴性；胃癌患者样本 18 例检测结果为 1 例阳性 17 例阴性；胃息肉 1 例检测结果为阴性；肝癌患者样本 1 例检测结果为阴性；肠道脂肪瘤患者样本 1 例检测结果为阴性。神经内分泌瘤样本 3 例检测结果为阴性。

因此，本试剂盒的阳性判断值为：ACTB 基因的 Ct 值 ≤ 36 ，甲基化 SDC2 基因 Ct 值 ≤ 38 时判断样本为阳性；ACTB 基因的 Ct 值 ≤ 36 ，甲基化 SDC2 基因 Ct 值 > 38 时判定为阴性样本；ACTB 基因 Ct 值 > 36 或者无 Ct 值时，判定为样本不合格。

【检验结果的解释】

1. 试验结束以后运行 Ct 值的计算，运行无模板对照（NTC）的 Ct 值 ≥ 40 或者没有出现扩增曲线时，说明试验无污染存在，可以继续分析试验情况。
2. 运行阳性质控品、阴性质控品 FAM 通道，阳性质控 Ct 值 ≤ 35 时，阴性质控 Ct 值 ≥ 40 或者无 Ct 值；Texas Red 通道阴性质控品、阳性质控品 Ct 值均 ≤ 35 时，说明实验体系正常，可以继续分析实验。
3. 在检测样本反应孔中 Texas Red 通道，一般 Ct 值 ≤ 36 ，可以继续分析，如果 Ct 值 > 36 则说明样本 DNA 量不足或者降解严重，不适合实验分析。
4. 在检测样本反应孔 FAM 通道中，在没有出现扩增曲线或者 Ct 值 > 38 的样本为阴性。出现 S 型扩增曲线且 Ct 值 ≤ 38 的样本为阳性。
5. 判定为阳性的样本的患者，建议进行肠镜检查以确诊；判定为阴性的患者不排除患病的可能；判定为样本不合格的，建议患者重新取样检测。
6. 干扰实验结果显示：粪便样品中分别含有以下物质：动物 DNA（500ng/ml）、植物组织（500ng/ml）、植物油（10 $\mu\text{l/ml}$ ）、通便类药物甘露醇（75mg/ml）、通便灵胶囊（7.25mg/ml）、痔疮膏（24.75mg/ml）、吗丁啉（0.14mg/ml）、四环素（10.65mg/ml）、青霉素（2.56mg/ml）、布洛

芬胶囊 75 $\mu\text{g/ml}$ 、胃药斯达舒（6.84mg/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）、感冒灵胶囊（0.27mg/ml）对检测结果无影响。

【检测方法的局限性】

1. 本检测试剂盒仅能检测使用本公司生产的粪便样本收集装置收集的粪便样本。其他途径收集的粪便样本不适用于本试剂盒的检测。
2. 样本的收集、存储以及 DNA 的提取和亚硫酸盐的处理需要按照要求进行，否则可能影响检测结果导致假阴性和假阳性的发生。
3. 本检测试剂盒检测结果仅供临床参考不得作为临床确诊的依据，应结合其他临床诊断结果进行判定。判定为阳性的患者，建议接受结肠镜检查以便确诊；判定为阴性的患者不排除患病的可能；判定为无效结果的样本，建议患者重新取样检测。

【产品的性能指标】

1. 外观：试剂盒组份齐全；包装外观清洁、无泄露、无破损；标志、标签字迹清楚。
2. 阴/阳性符合率
 - 2.1 阴性符合率：检测 8 份 SDC2 阴性参考品(N1~N8)，甲基化 SDC2 基因扩增结果应均为阴性。
 - 2.2 阳性符合率：检测 7 份 SDC2 阳性参考品(P1~P7)，甲基化 SDC2 基因扩增结果应均为阳性。
3. 特异性：检测 1 份 SDC2 特异性参考品 T，甲基化 SDC2 基因扩增结果呈阴性。
4. 灵敏度：检测 SDC2 灵敏度参考品 L 20 次，至少 17 次甲基化 SDC2 基因扩增呈阳性。
5. 精密度：分别检测 SDC2 精密度参考品 J1、SDC2 精密度参考品 J2 各 10 次，结果满足甲基化 SDC2 基因扩增呈阳性，同时内参基因 ACTB 扩增曲线正常。计算甲基化 SDC2 基因以及内参基因 ACTB 的 Ct 值的变异系数（CV）均不高于 5%。
6. 在多中心临床试验中，对 1213 例有效病例进行统计分析，结果表明本试剂盒对结直肠癌样本的检测敏感性为 84.22%（315/374），特异性为 97.85%（821/839），总符合率为 93.65%（1136/1213），Kappa 值为 0.85。其中有 10 例肠癌样本其 SDC2 基因 $38 < \text{Ct 值} \leq 39$ ，也应引起临床的重视。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断，使用前请详细阅读说明书并必须严格按照说明书进行操作。
2. 应由具备专业经验或经培训合格的人员进行操作。
3. 有关实验室管理规范请严格按照行业行政主管部门颁布的有关基因扩增检验实验室的管理规范执行。

- 实验室应按试剂准备区、样本处理区、反应液配置区、扩增检测分析区分隔使用。
工作流程：操作过程应工作服、帽、鞋、手套等穿戴齐全，各区物品均为专用，不得交叉使用，避免污染。
- 反应液分装时应尽量避免产生气泡，并注意防止泄漏，以免荧光物质污染仪器。
- 实验过程中若出现标本及试剂污染工作台及移液器，应及时用 10% 次氯酸钠或 75% 酒精处理。实验结束后应立即清洁工作台，并定期对工作台及各种实验用品进行消毒。
- 不要使用超过有效期的试剂，不同批次的产品不能混用。
- 加样所用的加样器需要定期检测，保证加样的准确性。
- 溶液 B 为亚硫酸盐溶液，操作时勿接触皮肤和眼睛；如果接触到应迅速擦干净用大量的水冲洗。
- 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。
- 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，避免接触到皮肤和粘膜；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《微生物生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

【标识的解释】

试剂盒标签所用图形符号	说明
	体外诊断试剂
	使用前阅读说明书
	温度极限

【参考文献】

- Tae Jeong oh, Sungwhan An, Genome-wide identification and validation of a novel methylation biomarker, SDC2, for blood-based detection of colorectal cancer, *The journal of Molecular Diagnostics*, July 2013 vol,15,No.4.
- Tae Jeong Oh, et al, Feasibility of quantifying SDC2 methylation in stool DNA for early detection of

colorectal cancer: *The Journal of Clinical Epigenetics*: 2017.

- Niu F, Wen J, Fu X, et al. Stool DNA Test of Methylated Syndecan-2 for the Early Detection of Colorectal Neoplasia[J]. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2017, 26(9):1411-1419.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：广州市康立明生物科技有限责任公司

注册人/生产企业住所：广州高新技术产业开发区科学城开源大道 11 号 A2 栋第六层

售后服务单位名称：广州市康立明生物科技有限责任公司

联系方式：020-82510982

邮 编：510530

网 址：www.creativebio.cn

Email: Service@creativebio.cn

生产地址：广州高新技术产业开发区科学城开源大道 11 号 A2 栋第六层、A3 栋第二层 202 区、A4 栋第五层（505 单位）。

生产许可证编号：粤食药监械生产许 20183293 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20183400506

【说明书核准及修改日期】2018 年 11 月 16 日及 2019 年 09 月 25 日