

RNF180/Septin9基因甲基化检测试剂盒（PCR荧光探针法）

——使用说明书

【产品名称】 通用名：RNF180/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

【预期用途】 该产品用于体外定性检测人血浆中甲基化的RNF180及Septin9基因。该产品适用于经临床医师诊断建议胃镜检查同时由于患者个人原因拒绝进行胃镜检查的患者。检测结果阳性不作为胃癌早期诊断或确诊的证据，检测结果阴性也不能排除胃癌的可能，患者最终诊断应依据胃镜检查检查结果。该产品不用于普通人群的肿瘤筛查。基于现有研究，仅限于有胃癌家族史者或40岁以上胃癌高风险人群检测。胃癌按《恶性肿瘤TNM分类法》的分期，在癌症早期几乎不会有症状，以消瘦为最多，其次为胃区疼痛、食欲不振、呕吐等。早期胃癌的首发症状，可为上腹不适(包括上腹痛，多偶发)，或饱餐后剑突下胀满、烧灼或轻度痉挛性痛，可自行缓解；或食欲 减退，稍食即饱。少数患者因上腹部肿物或因消瘦，胃穿孔或转移灶而就诊。但常因症状轻微和不典型而被忽视。RNF180（ring finger protein 180）是肿瘤抑制因子，RNF180启动子甲基化在胃癌组织中导致RNF180低表达或不表达，通过HGF、CCR-7、MMP-2、VEGF等多条信号通路促进胃癌细胞的发生及增殖。Septin9是Septin基因家族的一个成员，该基因家族至少有13个基因组成，它们编码保守的GTPase结构域，可以结合细胞骨架相关的蛋白质，和细胞分裂与肿瘤发生相关。研究发现，在胃癌患者血浆样本中甲基化的RNF180及Septin9基因含量特征性增高。

【检验原理】 RNF180/Septin9基因甲基化检测试剂盒（PCR荧光探针法）包括两个步骤。步骤1，使用血浆游离DNA提取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硫酸盐，发生甲基化的胞嘧啶则不会被亚硫酸盐转化；步骤2，甲基化的DNA做三重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，甲基化序列得到扩增，与甲基化RNF180基因和Septin9基因序列特异性结合的荧光素探针可以在PCR反应中专一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，两者在每一次检测中都需要同时加入。

【主要组成成分】

	试剂	主要成分	体积/数量
1	PCR反应液	dNTPs、PCR Buffer、引物和探针	0.96mL×2管
2	聚合酶	Taq DNA聚合酶	85 μL×1管
3	阴性对照品	WBC DNA、BSA和1×TE Buffer	3.6mL×3管
4	阳性对照品	细胞株DNA、WBC DNA、BSA和1×TE Buffer	3.6mL×3管

- 以下试剂和耗材是本试剂盒不包含，但对该实验必需的：
- 血浆游离DNA提取和亚硫酸盐转化试剂盒（推荐使用试剂盒名称：核酸提取试剂；备案号：京经械备20140053号；公司名称：博尔诚（北京）科技有限公司）
 - 无水乙醇（分子生物级别，浓度高于99.5%）；
 - 15 mL聚丙烯离心管带有圆锥型底，无菌；
 - 2.0 mL离心管，圆底带有联体螺旋型的密封盖；
 - 带有过滤装置的吸头，包括2~100 μL、50~1000 μL规格；
 - 连续分液器枪头，包括0.5 mL、1 mL、10 mL、25 mL规格；
 - 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；包括0.1mL、0.2mL规格；
 - 96孔板密封膜；
 - 96孔板密封膜的手动压膜器；
 - 可再封闭型塑料袋；10×15 cm；
 - 可竖立的5mL密封冻存管；
 - 采血管：如BD的10 mL，K2EDTA负压抗凝管。

【储存条件及有效期】 试剂盒有效期为12个月。请勿使用过期的试剂。不同批次的试剂盒不能混用。试剂盒于-25~-15℃条件下存储。每一管PCR反应液冻融次数不超过2次，使用两次后剩余的残液应丢弃。生产日期及失效日期详见产品标签。

【适用仪器】 ABI 7500、ABI 7500 Fast Dx。

【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K2EDTA抗凝采血管(如BDVacutainer® K2EDTA 10mL采血管)采血。
 - 采集后的血样应立即离心制备血浆，如不能及时处理，并于30分钟内放入2~8℃冰箱，且在2~8℃温度下保存的时间不超过8小时，不得冰冻血样。
 - 2 血浆样本的制备和保存
 - 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15 mL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3.5 mL血浆移入标记好的圆锥底的离心管中。
 - 制备好的血浆样本应立即放入-25~-15℃冰箱中，保存不超过2周。

【检验方法】

- 1 血浆游离DNA的提取
 - 按说明书的要求进行游离DNA的提取和亚硫酸盐的转化。
 - 若BisDNA不立即使用，可在2~8℃存储24小时，或在-25~-15℃存储72小时。
- 2 PCR检测
 - 2.1. PCR预反应液的准备
 - BisDNA样本：病人样本、阳性对照品、阴性对照品实行三次PCR平行测试。
 - 根据反应样本量，融化相应管数的PCR反应液，1管PCR反应液最多用于16个样本（包括阳性对照品和阴性对照品）。涡旋混匀PCR反应液10~15秒，短暂离心。
 - 每个PCR反应需要19.2 μL PCR反应液和0.8 μL聚合酶按表1的比例将相应体积的PCR反应液和聚合酶加入到2.0 mL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。

表1 PCR预反应液的准备

	5个样本量 (15个PCR反应)	10个样本量 (30个PCR反应)	15个样本量 (45个PCR反应)	20个样本量 (60个PCR反应)
PCR反应液	288.0 μL	576.0 μL	864.0 μL	1152.0 μL
聚合酶	12.0 μL	24.0 μL	36.0 μL	48.0 μL

注意：配制好的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。

- 2.2. PCR反应板准备 (Applied Biosystems 7500/Applied Biosystems 7500 Fast Dx)
 - 每个样本需要3次PCR平行反应，在96孔板孔中，每个PCR反应孔中加入18μL PCR预反应液和12μL的BisDNA。
 - 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。
 - 2.3 PCR扩增
 - 软件要求
- PCR过程可使用Applied Biosystems 7500，该仪器适配软件为SDS V2.0及以上版本。PCR过程可使用AppliedBiosystems 7500 Fast Dx，该仪器适配软件为SDS V1.4软件及以上版本。
- PCR反应板加载
- Passive Reference设置必须为“none”，Septin9选取FAM通道，RNF180选取ROX通道，ACTB选取JOE通道，如表2所示设置反应程序：

表2 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%	
		55.5℃	35秒	80%	X
		93℃	30秒	40%	
阶段3	降温	40℃	5秒	80%	

注：X代表荧光收集阶段

3 分析条件设置

3.1Applied Biosystems 7500设置

- 设置基线10~22个循环，设置ACTB阈值8000，RNF180阈值为8000，Septin9阈值16000。[*]
- 用对照品验证PCR反应的有效性：阳性对照品和阴性对照品的三次PCR重复均满足表2的参数要求时,则认为本次PCR反应有效。

3.2Applied Biosystems 7500 Fast Dx设置

- 设置基线10~22个循环，设置ACTB阈值30000，RNF180阈值25000，Septin9阈值75000。[*]
- 用对照品验证PCR反应的有效性：阳性对照品和阴性对照品的三次PCR重复均满足表3的参数要求时,则认为本次PCR反应有效。

[*]: 相同机型的不同机器，由于机器运行时间不同，分析时间阈值可作适当调整。

表3 PCR反应有效性参数信息

对照品结果	检测	RNF180结果	Septin9结果	ACTB结果
阳性对照品有效	PCR1	Ct≤40.0	Ct≤40.0	Ct≤29.6
	PCR2	Ct≤40.0	Ct≤40.0	Ct≤29.6
	PCR3	Ct≤40.0	Ct≤40.0	Ct≤29.6
阴性对照品有效	PCR1	undetermined	undetermined	Ct≤35.1
	PCR2	undetermined	undetermined	Ct≤35.1
	PCR3	undetermined	undetermined	Ct≤35.1

【质量控制】

1 外源对照

该试剂盒包含阳性对照品和阴性对照品。应在每次反应中添加这些对照品以检测反应是否成功，同时确保反应的有效性。阳性对照品和阴性对照品的反应Ct值应该在有效范围内，如表3，如果反应Ct值在其有效范围之外，此次测试结果无效。

2 内源对照

内源对照能够检测亚硫酸盐转化的ACTB（β-actin）DNA，同时能够检测样品是否满足实验要求（包括样本制备是否正确，样本DNA含量是否满足要求）。如表3，RNF180和Septin9 PCR反应的结果与ACTB PCR结果的Ct值相关。如果ACTB PCR结果的Ct值超出有效范围，则反应无效。因为过高的ACTB Ct值表示BisDNA浓度过低或者PCR反应的抑制。

【阳性判断值】

单次PCR结果的判定见表4：

表4 单次PCR反应的结果解释

单次PCR结果	RNF180结果	ACTB结果	单次PCR结果	Septin9结果	ACTB结果
RNF180 阳性	ΔCt*≤9.0	Ct≤34.8	Septin9阳性	Ct<45.0	Ct≤34.8
RNF180阴性	ΔCt* > 9.0或无ΔCt*值	Ct≤34.8	Septin9 阴性	Ct≥45.0或无Ct值	Ct≤34.8
无效	任意结果	Ct> 34.8	无效	任意结果	Ct> 34.8

*RNF180的Ct值与ACTB的Ct值差值。

注意：单次PCR结果的阴阳性以Ct值为判定标准，而不以S型曲线判定。

【检测结果的解释】

- 1 如果RNF180三次重复PCR反应中有两次或三次检测阳性，则样本的RNF180测试结果为“阳性”；如果RNF180三次结果有两次或三次为检测阴性，则样本的RNF180测试结果为“阴性”。见表5：

表5 样本中RNF180结果判读

PCR阳性结果次数	0/3	1/3	2/3	3/3
RNF180样品结果	阴性	阴性	阳性	阳性

- 2 如果Septin9三次重复PCR反应中有两次或三次检测阳性，则样本的Septin9测试结果为“阳性”；如果Septin9三次结果有两次或三次为检测阴性，则样本的Septin9测试结果为“阴性”。见表6：

表6 样本中Septin9结果判读

PCR阳性结果次数	0/3	1/3	2/3	3/3
Septin9样品结果	阴性	阴性	阳性	阳性

建议一次阳性，列为疑似，建议结合其他临床指标，择期复测。

- 3 如果结果为其它情况，视为无效。

- 4 如果样本中按表5和表6判断RNF180和Septin9中任意一个为检测阳性，则判定该样本为检测阳性。

- 5 如果样本中RNF180和Septin9同时为检测阴性，则判定该样本为检测阴性。见表7：

表7 样本RNF180和Septin9检测结果联合判读

阳性率		Septin9			
		0/3	1/3	2/3	3/3
RNF180	0/3	阴性	阴性	阳性	阳性
	1/3	阴性	阴性	阳性	阳性
	2/3	阳性	阳性	阳性	阳性
	3/3	阳性	阳性	阳性	阳性

【检测方法的局限性】

- 1 本试剂盒不包含血浆游离DNA提取和亚硫酸盐转化试剂盒，推荐使用本公司生产的“核酸提取试剂”。
- 2 该产品的使用者应该是接受过PCR反应训练的试验者。
- 3 由于胃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。样本的收集请严格按照【样本要求】中的要求进行。
- 4 此结果不能作为确诊胃癌的证据。任何甲基化RNF180和Septin9基因检测呈阳性的患者还需接受胃镜的进一步检查以便确诊。
- 5 其他消化道肿瘤如大肠癌、肝癌和食道癌会有一定检出。
- 6 因为胃癌的发病率会随着年龄的增长而发病人群会显示增加，低年龄段相关人群胃癌发病率低于高年龄段人群，低年龄段相关人群胃癌发病率低而导致的阳性预测值偏低，普通人浅表性胃炎也有百分之十几的该指标阳性检测率。为避免因可能导致过高的假阳性风险，故不建议在低年龄段相关人群中进行该检测。
- 7 该甲基化基因RNF180和Septin9基因检测试剂盒的检测结果应结合其它临床指标进行评估。
- 8 通过上千例临床试验证实，试剂盒测试胃癌的灵敏度为61.76%，特异性为85.07%。
- 9 胃部不适症状可能由多种原因引发，如胰腺癌、结肠癌等。本试剂盒为胃镜检查的补充手段，临床医师应结合做胃镜的临床指征，选择是否采用本试剂盒检测。
- 10 胃低级别内瘤变会有一定例数检出，胃高级别内瘤变会有较高漏检。

【产品性能指标】

1 产品的性能指标

1.1 最低检出限

测定检测限企业参考品(S1-S3)，结果为S1:RNF180阳性、Septin9阳性,S2: RNF180阳性、Septin9阴性，S3: RNF180阴性、Septin9阳性。

1.2 精密性

对精密度企业参考品(J)进行重复10次测试，全部为RNF180阳性、Septin9阳性，计算所测得RNF180、Septin9及ACTB Ct值的变异系数（CV），均应不高于5%。

1.3 阳性符合率

检测9份阳性企业参考品(P1-P9)，阳性符合率为100%。

1.4 阴性符合率

检测3份阴性企业参考品(N1-N3)，阴性符合率为100%。

2 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。

3 交叉反应情况

3.1 在以下临床诊断的疾病：慢性胃炎、肝癌、食管癌、肺癌、胰腺癌、乳腺癌、甲状腺癌、子宫内腺癌和宫颈癌等患者中，已观察到阳性检测结果。

3.2 胃部不适症状可能由多种原因引发，如胰腺癌、结肠癌等。

4 临床情况

4.1 通过1382例临床试验证实，试剂盒测试胃癌的灵敏度为61.76%，特异性为85.07%。

4.2 本试剂盒对病例组的检测灵敏度比传统蛋白肿瘤标志物高40%左右，其中在I期灵敏度比传统蛋白肿瘤标志物高40%左右，II期灵敏度比传统蛋白肿瘤标志物高50%左右。

4.3 本试剂盒检测年龄40岁以上和50岁以上组无明显差异，建议检测年龄为40岁以上人群；对照组中男性和女性的阳性率无差异；病例组中女性检测阳性率略高于男性。

4.4 本试剂盒对临床试验中前瞻性样本检测胃癌的灵敏性为62.10%，特异性为85.44%。

4.5 本试剂盒对临床试验中回顾性样本检测胃癌的灵敏性为61.69%，特异性为84.58%。

【注 意 事 项】

- ① 只能用于体外诊断。
- ② 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，我们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分析的专业人员完成。
 - 为防止PCR扩增产物的污染，我们建议严格区分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。
- ③ 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。受检人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。

【标识的解释】

无

【参 考 文 献】

- ① Kin-Fai Cheung, Cleo N. Y. Lam, et al. Characterization of the Gene Structure, Functional Significance, and Clinical Application of RNF180, a Novel Gene in Gastric Cancer. Cancer, February 15, 2012; p. 947–959.
- ② Jingyu Deng, Han Liang, et al. Methylation of CpG sites in RNF180 DNA promoter prediction poor survival of gastric cancer. Oncotarget, Vol. 5, No. 10: p. 3173–3183.

【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

联系方式：

客服热线：400-650-3186 邮政编码：100176
传真号码：010-67880132 网 址：http://www.biochainbj.com/

售后服务单位名称：

联系方式：

客服热线：400-650-3186 邮政编码：100176
传真号码：010-67880132 网 址：http://www.biochainbj.com/

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

生产许可证编号：

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】 国械注准20203400447

【说明书核准及修改日期】