

人 SHOX2、RASSF1A 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 SHOX2、RASSF1A 基因甲基化 DNA 检测试剂盒（PCR 荧光法）

【包装规格】

20 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人肺泡灌洗液中人 SHOX2 基因和人 RASSF1A 基因甲基化。

用于肺癌疑似人群肺泡灌洗液细胞学检查的辅助检查。

矮小同源盒基因 SHOX2(Short Stature Homobox2, SHOX2)是同源盒基因家族的一员,主要功能在于脊椎动物的胚胎形成的转录调节。研究发现, SHOX2 基因在多种实体肿瘤中表达异常,如肺癌、乳腺癌和肾癌。Ras 相关区域家族 1A(Ras-association domain family 1A, RASSF1A)基因调控的靶基因涉及基因转录、信号转导、细胞骨架、细胞周期、细胞黏附及凋亡等多方面,作为一种新型肿瘤抑制基因,在肿瘤发生及发展过程中的作用尤为重要,目前认为, RASSF1A 基因表达失活主要与启动子区异常的高甲基化、杂合性缺失及染色体缺失有关。

【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设计, FAM 荧光检测 RASSF1A 基因甲基化 DNA 状态, VIC (或 HEX) 荧光检测 SHOX2 基因甲基化 DNA 状态, CY5 荧光检测内标基因水平。

【主要组成成分】

名称	规格	数量	主要成分
PCR 反应液	310μL/管	1 管	PCR 反应组分, 扩增引物, 标记探针
DNA 聚合酶	7μL/管	1 管	热启动 DNA 聚合酶
质控品	20μL/管	1 管	含 SHOX2 和 RASSF1A 甲基化 DNA 的质粒
阴性对照	50μL/管	1 管	纯化水

备注:

质控品为含 SHOX2 和 RASSF1A 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份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:

天根生物的血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型), 货号: DP304-03

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

【储存条件及有效期】

在 ≤-20℃ 储存, 有效期为 9 个月。

本试剂盒经反复冻融验证 5 次内有效, 模拟运输验证 4 天内有效, 2~8℃ 开瓶稳定性验证 7 天有效。

生产日期和使用期限见标签。

【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】

1. 推荐样品类型: 肺泡灌洗液。
2. 肺泡灌洗液的采集请按照相关标准进行(中华医学会呼吸病学分会: 支气管肺泡灌洗液细胞学检测技术规范)。
3. 采集的肺泡灌洗液, 请尽快提取 DNA; 如果不能立即提取 DNA, 请离心分离脱落细胞并把细胞保存于 -20℃。肺泡灌洗液样本 2-8℃ 保存 2 个月, ≤-20℃ 保存 6 个月(6 个月以外未验证), ≤-20℃ 保存样本冻融 5 次内有效, 肺泡灌洗液经过提取纯化和亚硫酸盐修饰的 DNA 2-8℃ 保存 7 天, ≤-20℃ 保存 6 个月(6 个月以外未验证), ≤-20℃ 保存样本冻融 5 次内有效, 运输 4 天内有效。
4. DNA 提取

取 5ml~20ml 肺泡灌洗液, 2000rpm 离心 10 分钟, 去上清, 每份样本均可见芝麻大小的沉淀物, 此沉淀物即为灌洗液中细胞, 如无明显沉淀, 说明灌洗液中细胞含量过少, 需增加肺泡灌洗液体积, 再次离心或重新采样。去上清后剩余的细胞沉淀用于 DNA 提取。采用天根生物的血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型), 所提取的 DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.6-2.0。严格按试剂盒说明书操作, 提取的 DNA 可以立即用于检测; 如果不能立即检测, 请保存于 -20℃, 保存时间不要超过 6 个月。

5. 亚硫酸盐修饰

提取的 DNA, 取 20ul 用于亚硫酸盐修饰。采用 ZYMO RESEARCH 生物公司 EZ DNA Methylation-Direct™ Kit。亚硫酸盐修饰过程请严格按试剂盒说明书操作, 修饰后的 DNA 立即用于检测。

【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。

1. 取亚硫酸盐修饰后待测样本 DNA。
2. 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。
3. 按检测样本数量, 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)

4. 把 PCR 反应管按顺序摆放在 PCR 管架上(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 5 μL, 颠倒混匀(切勿振荡混匀), 小心盖上反应管盖, 瞬时离心。

5. 按步骤 3 的方法, 在反应管中分别加入处理好的质控品和阴性对照, 及时盖好封盖。

6. 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。

7. 打开仪器设置窗口, 设置 PCR 扩增与信号收集程序。

- a) 第一阶段: 95℃, 10 分钟, 1 个循环;
- b) 第二阶段: 95℃, 15 秒, 60℃ 30 秒, 5 个循环;
- c) 第三阶段: 95℃, 15 秒, 57℃ 30 秒, 40 个循环;

信号收集: 第三阶段 57℃ 时收集 FAM、VIC (或 HEX) 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。

8. 保存文件, 运行程序。

【阳性判断值】

- a. FAM 荧光信号的扩增曲线为光滑的‘S’形, 且 Ct 值 < 35, 提示 RASSF1A 基因甲基化阳性。
- b. VIC (或 HEX) 荧光信号的扩增曲线为光滑的‘S’形, 且 Ct 值 < 32, 提示 SHOX2 基因甲基化阳性。

【检验结果的解释】

1. 确定实验是否可信:

确定是否有 CY5 信号, 并且 CY5 信号 Ct 值小于 35。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、VIC 和 CY5 均应有信号, 阴性对照应无 FAM 和 VIC (或 HEX) 扩增信号, 无 CY5 信号。

2. 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 RASSF1A 基因甲基化阳性。如果 Ct 值 ≥ 35, 提示 RASSF1A 基因甲基化阴性或甲基化程度低于最低检出限。

3. 确认未选择校正荧光参照, 设置并分析 VIC 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 VIC 荧光信号的 Ct 值。当 VIC 荧光信号的扩增曲线为光滑的‘S’形, 且 Ct 值 < 32, 提示 SHOX2 基因甲基化阳性, 如果 Ct 值 ≥ 32, 提示 SHOX2 基因甲基化阴性或甲基化程度低于最低检出限。

4. 在标本检测时, 有 3 种可能: RASSF1A 基因和 SHOX2 基因均甲基化 DNA 检测阳性、只有 RASSF1A 基因甲基化 DNA 检测阳性、只有 SHOX2 基因甲基化 DNA 检测阳性, 这 3 种情况均判定该标本甲基化 DNA 检测阳性。

5. 在标本检测时, RASSF1A 基因和 SHOX2 基因均甲基化 DNA 检测阴性, 判定该标本甲基化 DNA 检测阴性。

6. 对质控品进行检测, 质控品中 FAM 信号的 Ct 值小于 35 和 VIC 信号的 Ct 值小于 32 且均有明显的 S 型曲线。

7. 本次临床验证以 DNA 甲基化测序方法作为对比试验方法和考核试剂共检测标本 1001 例, 测序方法检测出基因甲基化 528 例, 考核试剂检测出基因甲基化 540 例; 测序方法检测出基因正常 473 例, 考核试剂检测出基因正常 461 例; Kappa 一致性分析知 Kappa 值为 0.95, 阳性符合率为 98.67%, 阴性符合率为 96%, 总符合率为 97.4%。

另以临床诊断金标准为参照, 将考核试剂检测结果与细胞学检查结果进行对比, 并对肺癌不同分期、分型、大小、位置进行分层统计分析:

肺癌组中, 考核试剂(联合)、细胞学检查、考核试剂 SHOX2 和考核试剂 RASSF1A 的灵敏度分别对应为 78%、53%、74% 和 48%。(以下项目名称排序与此一致) ①若按肺癌分期进行统计, 肺癌 I 期患者其对应的检测灵敏度分别为 74%、27%、68% 和 46%; 肺癌 II 期患者其对应的检测灵敏度分别为 79%、49%、78% 和 52%; 肺癌 III 期患者其对应的检测灵敏度分别为 79%、64%、76% 和 48%; 肺癌 IV 期患者其对应的检测灵敏度分别为 81%、66%、75% 和 50%; ②若按肺癌分型进行统计, 鳞癌患者其对应的检测灵敏度分别为 88%、69%、88% 和 43%; 腺癌患者其对应的检测灵敏度分别为 66%、39%、58% 和 40%; 小细胞癌患者其对应的检测灵敏度分别为 94%、60%、91% 和 86%; ③若按肿瘤大小进行分类统计, 肿瘤大小 ≤ 1.0cm 其对应的检测灵敏度分别为 76%、50%、74% 和 48%; 肿瘤大小 > 1cm 且 < 5cm 其对应的检测灵敏度分别为 78%、47%、72% 和 52%; 肿瘤大小 ≥ 5cm 其对应的检测灵敏度分别为 79%、56%、76% 和 52%; ④若按肿瘤位置进行分类统计, 中央型患者其对应的检测灵敏度分别为 84%、66%、81% 和 53%; 周围型患者其对应的检测灵敏度分别为 73%、41%、67% 和 44%。

对照组中, 考核试剂(联合)、细胞学检查、考核试剂 SHOX2 和考核试剂 RASSF1A 的特异性分别对应为 81%、97%、85% 和 91%, 其中考核试剂检测结果出现 82 假阳性。截止 2017 年 8 月 10 号, 通过对此 82 例患者进行随访, 已确定 23 例患者为肺癌阳性。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考, 对个体的最终诊断应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查等情况综合考虑。
2. 阴性结果不能完全排除靶基因甲基化 DNA 的存在, 样本中肿瘤细胞过少、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。
3. 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。
4. 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。
5. 试剂盒含有一个内标基因的检测体系, 内标基因为管家基因, 如果亚硫酸盐修饰过程失败, 会出现不正常的 CY5 信号。根据 CY5 信号, 可以监控加入的 DNA 量和修饰过程。

【产品性能指标】

1. 阳性参考品符合率

a) 采用经标化的企业 RASSF1A 两种浓度 (2500copies/test 和 1000copies/test) 参考品进行检测, 结果对应的检测位点为阳性且内标 Ct 小于 35。

b) 采用经标化的企业 SHOX2 两种浓度 (2500copies/test 和 1000copies/test) 参考品进行检测, 结果对应的检测位点为阳性且内标 Ct 小于 35。

2. 特异性参考品符合率

a) 正常人基因组参考品进行检测, 结果各检测位点均为阴性且内标 Ct 小于 35。

b) 检测范围外的 6 种参考品进行检测, 结果各检测位点为阴性且内标 Ct 小于 35。

c) 其他肺部良性疾病样本 DNA 进行检测, 结果各检测位点为阴性且内标 Ct 小于 35。

d) 非人类基因组(金黄色葡萄球菌)进行检测, 结果各检测位点为阴性。

3. 重复性

经企业标化的含有 RASSF1A,SHOX2 基因混合参考品（浓度为 250copies/test）进行 10 次平行检测，结果相应位点均为阳性且 Ct 值的变异系数（CV,%） $\leq 5\%$ 且内标 Ct 值小于 35。

经企业标化的含有 RASSF1A,SHOX2 基因混合参考品（浓度为 250copies/test）进行为期 20 天的连续检测，每天分为上午和下午完成 2 次检测，室内精密度 Ct 值的变异系数（CV,%） $\leq 5\%$ 且内标 Ct 值小于 35。

4. 最低检测限

试剂盒检测的 RASSF1A,SHOX2 基因参考品最低检测限应不高于 250copies/test。在甲基化比例为 5%时反应终体系中甲基化核酸浓度的最低检测限为 250copies/test。

5. 质控品

质控品进行检测，结果对应的检测位点为阳性；阴性对照进行检测，结果对应的检测位点为阴性。

6. 干扰实验

a) 对含有痰液和血液样本有抗干扰能力。

b) 选用弱阳性样本以及阴性各 3 份，将弱阳性样本以及阴性样本平均分成两份，没有添加干扰物质的样本分别标记为 S1, S2, S3, S4, S5, S6；添加干扰物质胆红素样本标记为 S1(D), S4(D)；添加甘油三酯样本标记为 S2(G), S5(G)；添加血红蛋白的样本标记为 S3(X), S6(X)，结果添加干扰物质前后结果保持一致。

7. 肺泡灌洗液采样量、保存方法和时间以及处理方法

收集的肺泡灌洗液样本的体积在 5-20ml 均能满足实验要求，但保证灌洗液去上清后可见细胞沉淀物。

肺泡灌洗液（离心分离后细胞保存在细胞保存液中）常温保存 7 天，2-8℃保存 2 个月， $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 保存 6 个月（6 个月以外未验证）。

肺泡灌洗液标本采用天根生化科技（北京）有限公司的血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱型）（货号：DP304-03）进行核酸提取。

【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. 一般情况下，DNA 用量不宜超过 5ug/反应，但 CY5 信号出现较晚时，需相应增加 DNA 量。

5. 检测所用的 DNA 质量非常重要，推荐使用商业化的 DNA 提取试剂盒。

6. 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。

7. 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。

8. 实验时应注意防止外源 DNA 对试剂的污染，先加样品 DNA，然后进行阳性质控品的操作。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。

9. 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。

10. 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。

11. 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] Shenker NS, Polidoro S, van Veldhoven K, et al. Hum Mol Genet.

2013;22(5):843-851.

[2] Steven A, John T, Li-Hua Xu, et al. J Natl Cancer Inst, 1999, 91:332-339.

[3] Ito M, ho G, Kondo M, et al. Cancer Lett.2005, 225: 131-139.

[4] Hubers AJ, Heideman DA, Burgers SA, et al. Br J Cancer.

2015;112(6):1105-1113.

[5] Schmidt B, Liebenberg V, Dietrich D, et al. BMC Cancer, 2010, 10:600.

[6] Dietrich D, Hasinger O, Liebenberg V, et al. Diagnostic Molecular Pathology,

2012, 21(2):93-104.

[7] Anglim PP, Galler JS, Koss MN, et al. Mol Cancer 2008, 7:62.

[8] Hsu HS, Chen TP, Hung CH, et al. Cancer 2007, 110:2019-2026.

[9] Schmiemann V, Bocking A, Kazimirek M, et al. Clin Cancer Res 2005,

11:7728-7734.

[10] Tsou JA, Galler JS, Siegmund KD, et al. Mol Cancer 2007, 6:70.

【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 20173403354

【说明书核准及修改日期】2022.11.06