

人 CDO1 和 CELF4 基因甲基化检测试剂盒 (PCR-荧光探针法)产品说明书

【产品名称】

通用名称：人 CDO1 和 CELF4 基因甲基化检测试剂盒(PCR-荧光探针法)

【包装规格】

12 人份/盒、24 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人宫颈脱落细胞 DNA 中 CDO1 和 CELF4 基因的甲基化水平。

临床上与超声等其他诊断方法联合用于疑似子宫内膜癌患者的辅助诊断。检测结果阳性不能作为肿瘤早期诊断或者确诊的依据，检测结果阴性也不能排除子宫内膜癌的可能。临床医生应该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。该检测不宜用于普通人群的肿瘤筛查。

DNA 甲基化是表观遗传学中的一种，是在 DNA 5'端对胞嘧啶进行共价修饰，这种修饰通常与基因沉默相关。异常的甲基化在癌症的发生发展过程中起着重要作用。在以子宫内膜癌患者为对象的甲基化研究中发现，CDO1 (Cysteine Dioxygenase Type 1) (简称 C1)和 CELF4 (CUGBP Elav-Like Family Member 4) (简称 C4)基因 CpG 岛的甲基化水平比正常人明显升高，即发生超甲基化现象。多个病理确诊的子宫内膜癌病理研究报告都表明可以通过检测人宫颈脱落细胞 DNA 中 C1 和 C4 基因的甲基化情况来识别是否发生子宫内膜病变。

【检验原理】

本检测试剂盒采用重亚硫酸盐转化技术和荧光定量 PCR 技术对基因的甲基化情况进行定性检测，具体如下：

重亚硫酸盐转化：将提取的宫颈脱落细胞 DNA 利用重亚硫酸盐转化，使未发生甲基化的胞嘧啶转变成尿嘧啶，而发生甲基化的胞嘧啶则不会发生转变；

荧光定量 PCR：利用特异性引物结合荧光探针技术，检测 DNA 样本中是否存在发生甲基化的位点。特异性引物能够选择性地扩增发生甲基化的基因，而荧光探针在 Taq 酶的作用下水解释放荧光，在实时荧光定量 PCR 仪上进行 DNA 样本的甲基化检测。

【主要组成成分】

1、产品中包含的试剂组分

表 1 试剂盒主要组成成分

序号	产品组成	主要成分	规格及装量	
			12 人份	24 人份
1	人 C1 和 C4 甲基化反应液	Taq 酶、Mg ²⁺ 、dNTP 等	180μL×1 管	360μL×1 管
2	人 C1 和 C4 甲基化引探混合液	引物、探针	60μL×1 管	120μL×1 管
3	人 C1 和 C4 阳性质控品	含相关检测基因甲基化序列的质粒	30μL×1 管	60μL×1 管
4	人 C1 和 C4 阴性质控品	纯化水	30μL×1 管	60μL×1 管

注 1：不同批次之间同一组分不可相互替换。

注 2：试剂盒以外必需的设备及材料

- 1) 荧光定量 PCR 仪
- 2) 生物安全柜
- 3) 一次性使用宫颈采样拭子、移液器及吸头
- 4) 离心管、离心机
- 5) PCR 反应管

2、需要但未提供的试剂

宁波华莱斯医疗器械有限公司生产的一次性使用宫颈采样拭子（浙械注准 20172181163）（A1 规格，刷杆由聚丙烯（PP）制成，刷头由聚乙烯（PE）制成）；豪洛捷公司的 PreservCyt®Solution 细胞保存液（国械备 20140197）货号为 70098-004，体积 20mL；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）（京

昌械备 20200061）（货号为 DP304）和 Zymo Research 公司的 EZ-96 DNA Methylation-Lightning™ MagPrep（货号 D5046）。

【储存条件及有效期】

-20±5℃ 避光保存，有效期 8 个月。

开管后稳定保存不超过 2 个月，反复冻融次数不超过 3 次。

采用干冰密封运输，运输温度以及开箱温度范围在-80℃~-15℃，运输时间不超过 5 天。到货后按照-20±5℃ 条件下保存，产品可稳定保存至产品效期末。

生产日期和有效期至：见标签。

【适用仪器】

适用于 SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统。

【样本要求】

1 检测样本类型：宫颈脱落细胞。

2 样本收集

采用一次性使用宫颈采样拭子（A1 规格，刷杆由聚丙烯（PP）制成，刷头由聚乙烯（PE）制成）采集宫颈脱落细胞，保存在含有细胞保存液的样本管中，在常温（15℃-30℃）下保存不超过 9 个月。

【检验方法】

1 样本处理

1.1 核酸提取：利用细胞 DNA 提取试剂盒进行宫颈脱落细胞 DNA 提取(推荐提取量为 2~3mL)，提取完毕后建议立即进行重亚硫酸盐转化。若提取的 DNA 不立即使用，可将其置于-20±5℃ 储存不超过 9 个月，期间冻融不超过 3 次，推荐标准转化上样量为 1000ng，建议转化上样量不低于 200ng。

1.2 重亚硫酸盐转化：利用 DNA 重亚硫酸盐转化试剂盒处理提取后的核酸，转化完成的 DNA(Bis-DNA)建议立即进行 PCR 检测，若不立即使用，可将 Bis-DNA 置于-20±5℃ 储存不超过 9 个月，期间冻融不超过 3 次。

2 试剂配制

2.1 提前将试剂盒各组分取出，室温融化，漩涡震荡 10 秒，2000rpm 离心 10 秒去除管壁上的液体。

2.2 试剂配制

2.2.1 待检测数为 n，所需要配制的反应数 N=待检测数(n)+1。计算加到反应混合物中的各个试剂的量，计算如下：

表 2 体系配制

试剂	人 C1 和 C4 甲基化反应液	人 C1 和 C4 甲基化引探混合液
体积 (μL)	15×N	5×N

2.2.2 取 1.5mL 离心管配制反应体系，试剂全部加入后漩涡震荡 10 秒，2000rpm 离心 10 秒去除管壁上的液体。

2.2.3 将上述反应液按 20μL/管分装到 PCR 反应管中。

3 加样

将转化完成的 Bis-DNA、阴性质控品和阳性质控品分别加样 5μL，然后小心盖上 PCR 反应管的管盖（避免气泡产生），2000rpm 离心 10 秒，然后立即进行 PCR 扩增反应。

4 PCR 扩增程序设置

按下表设置仪器扩增相关参数并开始扩增。

表 3 PCR 扩增程序

序号	阶段	温度	时间	循环数
1	预变性	96℃	10 分钟	1
2	变性	94℃	15 秒	45
	退火	64℃	5 秒	
	延伸、荧光采集	60℃	30 秒	
3	仪器冷却	25℃	1 分钟	1

靶基因 CDO1: FAM 通道; 靶基因 CELF4: ROX 通道; 内标基因 GAPDH: HEX 通道 (或 VIC 通道)

5 质量控制

5.1 阴性质控品: 内标通道与靶基因通道检测均无 S 型扩增曲线或检测 Ct 值 >40。

5.2 阳性质控品: 内标通道与靶基因通道检测均有 S 型扩增曲线且 $25 \leq Ct \leq 31$ 。

以上两个条件必须在同一次实验中全部满足, 否则本次实验结果无效。

注: 扩增曲线不成标准 S 型曲线, 如无明显对数增长长期或者是线性曲线导致扩增曲线与阈值线的交叉, 被认为是阴性结果。

【阳性判断值】

阈值的设定: 根据内标扩增曲线的拐点处为阈值线, 得到各反应管的 Ct 值。

各个反应管 FAM 通道 (基因 CDO1) 的 Ct 值为 CtC1, ROX 通道 (基因 CELF4) 的 Ct 值为 CtC4, HEX 通道 (内标基因 GAPDH) 的 Ct 值为 CtG。ΔCtC1 和 ΔCtC4 为相应的靶基因与 CtG 的差值。按照表 4 进行结果判定。

表 4 反应结果的判定

	GAPDH	C1 和 C4 基因可能情况	
阳性	CtG<32.2	情况 1	C1 基因: ΔCtC1≤8.4 C4 基因: ΔCtC4>8.8
		情况 2	C1 基因: ΔCtC1>8.4 C4 基因: ΔCtC4≤8.8
		情况 3	C1 基因: ΔCtC1≤8.4 C4 基因: ΔCtC4≤8.8
阴性	CtG<32.2	情况 1	C1 基因: ΔCtC1>8.4 C4 基因: ΔCtC4>8.8
无效	CtG≥32.2	不予判定	

注: 扩增曲线不成标准 S 型曲线, 如无明显对数增长长期或者线性曲线导致扩增曲线与阈值线的交叉, 被认为是无判读; 无判读的 Ct 值默认为 45。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒仅用于临床辅助诊断, 不能以本试剂盒检测结果作为临床诊断的唯一根据。
2. 本试剂盒仅用于 C1 和 C4 基因甲基化的定性检测, 无法判断甲基化发生程度。
3. 由于肿瘤检测依赖于样品中肿瘤 DNA 的量, 所以可能受样品收集过程、样品储存方式、病人个体因素以及肿瘤级别影响。因此宫颈脱落细胞的采集、细胞 DNA 制备和储存均应按照要求进行, 否则可能导致错误的检测结果。
4. 由于扩增的初始靶 DNA 含量较低, 并且反应循环数较多。故应尽量避免检测环境的污染而产生假阳性信号。

【产品性能指标】

1 准确度

1.1 阴性符合率: 检测 9 份阴性参考品 N1~N9, 检测结果均为阴性。

1.2 阳性符合率: 检测 9 份阳性参考品 P1~P9, 检测结果均为对应的阳性。

2 检测限

检测 3 份最低检测限参考品 L1~L3, 分别重复 3 次, 检测结果均为对应的阳性。

研究表明, 检测限为 60808 copies/μL 野生型 DNA 背景下 5% 的 CDO1 基因或 CELF4 基因的甲基化 DNA。

3 精密度

3.1 检测 3 份精密度参考品 J1~J3, 分别做 10 次重复, 检测结果 J1 和 J2 均为对应的阳性, 检测结果 J3 均为阴性, 且靶基因 Ct 值的变异系数(CV)均≤5.0%。

3.2 使用试剂盒检测不同浓度和不同甲基化比例的中强阳性、弱阳性以及阴性临床样本, 连续 20 天由不同实验员、不同实验室进行检测的日内、日间、批内、批间、人员、室间以及总不精密度的 CV 值均≤5%。

4 分析特异性

4.1 交叉研究: 本试剂盒与 SDC2、TFPI2、RNF180、Septin9、SHOX2、PTGER4 和 RASSF1A 常见甲基化基因无交叉反应。同时, 本试剂盒对 19 种人生殖道寄生微生物以及性传播疾病病原体 (包括单纯疱疹病毒 II 型、梅毒螺旋体、解脲支原体、人型支原体、淋球菌、白色念珠菌、阴道毛滴虫、沙眼衣原体、阴道加德纳氏菌、短小芽孢杆菌、鲍曼不动杆菌、耻垢分枝杆菌、脆弱类杆菌、阴沟肠杆菌、粪肠球菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、甲型链球菌) 均有良好的检测特异性。本试剂盒对其他女性生殖道肿瘤宫颈癌和卵巢癌均具有良好的检测特异性。

4.2 干扰研究: 甲硝唑含量为 10mg/ml、壬苯醇醚栓含量为 20mg/ml、抗炎胶囊含量为 5mg/ml、33% 的人体润滑液、血红蛋白 5mg/ml、牛血清白蛋白 50g/L 时, 50% 宫颈粘液、白细胞含量为 1×10^6 cells/mL 时均不影响试剂盒对弱阳性样本和阴性样本的检测结果。

5. 临床试验结果: 在 4 家临床试验机构进行临床试验, 共纳入 4818 例临床样本。考核试剂与组织病理学金标准相比, 在子宫内膜癌中的检测灵敏度为 94.51%, 临床特异性为 94.16%; 在 EIN/AH 中的检测灵敏度为 83.16%, 临床特异性为 97.66%。

【注意事项】

1. 本产品仅用于体外诊断, 使用前请仔细阅读本说明书。
2. 实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范, 实验过程分区进行 (试剂准备区、样本处理区、扩增区), 实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备, 各区用品不能交叉使用。
3. 实验操作人员应接受过基因扩增或分子生物学方法检测的专业培训, 具备相关的实验操作资格, 实验室应具备合理的生物安全防护设施及防护程序。
4. 样本处理在生物安全柜内进行操作, 防止污染环境和保护操作者。因操作易发生污染, 宜采用带滤芯枪头, 以免发生交叉污染。
5. 实验后的废弃物, 如吸头、扩增产物等需进行无害化处理后方可丢弃。
6. 实验完毕后使用 10% 次氯酸或 75% 乙醇处理操作台面和移液器、离心机、PCR 仪等仪器表面, 然后紫外灯照射 25~30 分钟。
7. 不同批次之间同一组分不可相互替换, 请在有效期内使用本试剂盒, 不使用本试剂盒中的组分进行实验可能会导致错误的结果。

【参考文献】

- [1] 《体外诊断试剂注册与备案管理办法》
- [2] 《体外诊断试剂说明书编写指导原则》
- [3] Integrated Epigenomics Analysis Reveals a DNA Methylation Panel for Endometrial Cancer Detection Using Cervical Scrapings, Clin Cancer Res. 2017 Jan 1;23(1):263-272.
- [4] Combined genetic mutations and DNA-methylated genes as biomarkers for endometrial cancer detection from cervical scrapings, Clinical Epigenetics. 2019.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 北京起源聚禾生物科技有限公司

住所: 北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地华佗路 50 号院 5 号楼 4 层 401 室

联系方式: 010-51071017

售后服务单位: 北京起源聚禾生物科技有限公司

联系方式: 010-51071017

生产地址: 北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地华佗路 50 号院 6 号楼 4 层 A 区、北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地华佗路 50 号院 18 号楼 3 层

生产许可证编号: 京药监械生产许 20230015 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20243402610

【说明书核准日期及修改日期】2024.12.19