

人 septin9 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 septin9 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

96 测试盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人外周血血浆中 septin9 基因甲基化。

septin9 基因位于 17q25.3，含有 17 个外显子，septin9 蛋白有多个亚型（如 SEPT9-v1、v2、v3、v4），与染色体分离、DNA 修复、迁移、凋亡等细胞功能有关。多项研究证实，septin9 基因的 v2 亚型启动子区 CpG 岛甲基化与结直肠癌的发生发展密切相关^[1-3]。

对于拒绝或者无法进行肠镜检查的患者，可使用人 septin9 基因甲基化检测试剂盒进行检测。其它疾病如慢性胃炎、食管炎、非类风湿关节炎、肺癌、乳腺癌和前列腺癌患者以及孕妇中，也可能观察到阳性结果^[2,4-6]。本产品用于临床上对结直肠癌的辅助诊断，适用人群 30~80 岁，检测结果阳性不作为结直肠癌早期诊断或确诊的证据，检测结果阴性也不能排除结直肠癌的可能。不能作为普通人群的肿瘤筛查。

【检验原理】

本试剂盒基于实时荧光定量 PCR 平台，利用甲基化特异性引物和 Taqman 特异性荧光检测技术，偏向扩增和检测甲基化片段。重亚硫酸盐处理 DNA 可将未甲基化的胞嘧啶转化成尿嘧啶，甲基化特异性引物特异识别甲基化片段，偏向扩增甲基化模板，Taqman 探针特异性识别甲基化片段，鉴别甲基化片段的存在。另通过 Blocker 与非甲基化片段的结合，抑制高浓度野生型 DNA 可能存在的翘尾现象。本试剂盒选择 septin9 和内参基因 ACTB 同时扩增的双重 PCR 受控体系，通过阳性质控品和阴性质控品与样本平行提取、硫化纯化、PCR 检测，可对样本的检测过程进行质控。

【主要组成成分】

试剂盒由 4 部分组成，分别为血浆游离 DNA 提取试剂、DNA 硫化纯化试剂、PCR 检测试剂和质控试剂（详见表 1~4）。

表 1 血浆游离 DNA 提取试剂

组分	数量	规格	保存条件	说明
蛋白酶 K*	2 支	100mg/支	粉末于-25~-15℃保存；加 2.5ml 蛋白酶 K 溶解液溶解后 2~8℃保存	蛋白酶 K
蛋白酶 K 溶解液	1 瓶	6ml/瓶	室温（15~30℃）保存	三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液，氯化钙
裂解液	2 瓶	70ml/瓶	室温（15~30℃）保存	盐酸胍、尿素等
磁珠	2 支	1ml/支	室温（15~30℃）保存	二氧化硅磁珠
提取漂洗液	1 瓶	70ml/瓶	室温（15~30℃）保存	三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液
洗脱液	4 支	1ml/支	室温（15~30℃）保存	纯化水（pH=8.0）

表 2 DNA 纯化试剂

组分	数量	规格	保存条件	说明
纯化试剂*	10 支	600mg/支	粉末于室温（15~30℃）避光保存；加 1mL 水溶解后，-25~-15℃ 避光保存	亚硫酸氢钠粉末
DNA 保护液	1 支	1.2mL/支	2~8℃ 避光保存	6-羟基-2,5,7,8-四甲基苯并二氢吡喃-2-羧酸溶液
结合液	1 瓶	60mL/瓶	室温（15~30℃）保存	盐酸胍溶液
磁珠	1 支	1mL/支	室温（15~30℃）保存	二氧化硅磁珠
纯化漂洗液 1**	1 瓶	12mL/瓶	室温（15~30℃），加入无水乙醇后仍室温（15~30℃）保存	三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液，使用前加入 48mL 无水乙醇，得到 60mL 的使用体积
纯化漂洗液 2**	1 瓶	4mL/瓶	室温（15~30℃），加入无水乙醇后仍室温（15~30℃）保存	氢氧化钠溶液，使用前加入 16mL 无水乙醇，得到 20mL 的使用体积
纯化漂洗液 3**	1 瓶	4mL/瓶	室温（15~30℃），加入无水乙醇后仍室温（15~30℃）保存	乙酸溶液，使用前加入 16mL 无水乙醇，得到 20mL 的使用体积
洗脱液	4 支	1mL/支	室温（15~30℃）保存	纯化水（PH=8.0）

表 3 PCR 检测试剂

组分	数量	规格	保存条件	说明
PCR 反应液	2 支	800μL/支	-25~-15℃ 避光保存	荧光信号：羧基荧光素（FAM），六氯荧光素（HEX）
DNA 聚合酶	1 支	40μL/支	-25~-15℃ 保存	酶活：5U/μL
纯化水	1 支	1mL/支	2~8℃ 保存	用途：作为无模板对照

表 4 质控试剂

组分	数量	规格	保存条件	说明
阳性质控品	12 支	1.2mL/支	-25~-15℃ 保存	三羟甲基氨基甲烷--乙二胺四乙酸缓冲液，牛血清蛋白，Hela 细胞 DNA
阴性质控品	12 支	1.2mL/支	-25~-15℃ 保存	三羟甲基氨基甲烷--乙二胺四乙酸缓冲液，牛血清蛋白，Jurkat 细胞 DNA

注：

1. 洗脱液和磁珠在提取和纯化过程中可通用。
2. *表示粉末，需加入相应体积的溶剂溶解后才能使用；**表示浓缩缓冲液，需加入相应体积的无水乙醇才能使用。
3. 实验需要但试剂盒中未提供的试剂如下：
异丙醇：在提取部分使用。

无水乙醇：提取部分需要自己配制 85%乙醇，硫化纯化试剂中的漂洗液 1、2、3 需要加入相应体积的无水乙醇才能使用。

纯化水：用于溶解硫化试剂。

【储存条件及有效期】

1. 试剂盒有效期为 6 个月。
血浆游离 DNA 提取试剂：蛋白酶 K 于-25~-15℃存储；其它试剂于室温（15~30℃）存储。
DNA 硫化纯化试剂：DNA 保护液于 2~8℃存储；其它试剂于室温（15~30℃）存储。
PCR 检测试剂：纯化水于 2~8℃存储；其它试剂于-25~-15℃存储。
质控试剂：于-25~-15℃存储。
2. 所有试剂开封后在所需的储存条件下可存储 8 周。
其中溶解后的蛋白酶 K 溶液于 2~8℃存储；溶解后的硫化试剂于-25~-15℃存储；加入无水乙醇后的纯化漂洗液 1、纯化漂洗液 2 和纯化漂洗液 3 于室温（15~30℃）存储；其它试剂开封后，于原储存条件下存储。
3. 其中硫化试剂、DNA 保护液、PCR 反应液需避光存储。
4. 请严格按照说明上规定的条件进行保存，冻存试剂避免反复冻融，冻融次数不得超过 8 次。
5. 试剂盒应采用低温运输，运输不超过 3 天，保证试剂包装在运输途中不受损坏，试剂不泄露。
6. 生产日期及使用期限：见标签。

【适用仪器】

Roche LightCycler® 480。

【样本要求】

1. 检测样本类型：血浆。
2. 全血样本采集及保存
 - 1) 采血量不少于 5mL。
 - 2) 采血方法：选择含 EDTA 抗凝剂的采血管进行采血，切忌使用含枸橼酸钠或肝素抗凝剂的采血管采血，采血后上下颠倒抗凝采血管 2 次，轻轻混匀。
 - 3) 采集后的全血样本应立即处理。若不能立即处理，应在室温（15~30℃）保存不超过 4 小时，或者在 2~8℃保存不超过 24 小时，不可冻存全血。
3. 血浆样本的制备及保存
 - 1) 血浆制备：离心装有全血的采血管 12 分钟，离心力为 1350±150rcf。从离心机取出采血管，用一个干净的一次性移液管将血浆转移到圆锥底的 15mL 离心管中。离心血浆 12 分钟，离心力为 1350±150rcf，用一次性新的移液管将血浆转移到新的离心管中。
注：禁止使用离心机刹车功能，防止破坏血细胞层。
 - 2) 保存条件：血浆样本可在 2~8℃保存不超过 18 小时，在 -25~-15℃保存不超过 28 天，-80℃以下保存不

超过6个月。

【检验方法】

1. 血浆游离 DNA 提取

1.1 实验前试剂准备：

蛋白酶 K 溶液制备：取出 1 支蛋白酶 K 平衡至室温（15~30℃），加入 2.5mL 蛋白酶 K 溶解液，涡旋振荡 5 分钟使其完全溶解。

1.2 提取步骤如下：

- 1) 取出 2 支阴性质控品和 2 支阳性质控品于室温（15~30℃）放置 30 分钟，至完全融化；如果样本为冻存样本，将样本在室温（15~30℃）放置 30 分钟，至完全融化。
- 2) 取 1 支干净的 15mL 离心管，加入 80μL 蛋白酶 K 溶液，依次加入 2mL 血浆（或者质控品）、4mL 裂解液，盖紧管帽后涡旋振荡混匀，56℃ 水浴 15~20 分钟。
- 3) 室温（15~30℃）放置 2 分钟，向离心管中加入 6mL 异丙醇，涡旋振荡，使其完全混匀。
- 4) 将磁珠振荡混匀，加入 50μL 磁珠，涡旋振荡混匀后，室温旋转（10~20rpm）振荡 20 分钟。
- 5) 将 15mL 离心管置于磁力架上，磁珠完全吸附后，弃去上清。
- 6) 加入 1mL 提取漂洗液，涡旋振荡将磁珠重悬后，用一次性吸管移液器移至一个新的 2mL 的离心管中。
注：将磁珠悬浮液尽可能多的移至 2mL 离心管。
- 7) 将离心管置于磁力架上，磁珠完全吸附后，弃去上清。
- 8) 加入 1mL 提取漂洗液，涡旋振荡混匀后，将离心管置于磁力架上，磁珠完全吸附后，弃去上清。
- 9) 加入 1mL 85%乙醇，涡旋振荡混匀后，将离心管置于磁力架上，磁珠完全吸附后，弃去上清。
- 10) 重复步骤 9)。
- 11) 用 20~200μL 移液器将残留液体吸干，室温静置 10 分钟。
- 12) 向离心管中加入 100μL 预热到 80℃ 的洗脱液，涡旋振荡或者 20~200μL 移液器吸打混匀。
- 13) 80℃ 加热 10 分钟。
- 14) 瞬离后，将离心管置于磁力架上，磁珠完全吸附后，吸取纯净上清至新的离心管，弃去含有磁珠的离心管。

注：提取后的血浆 DNA 若不立刻进行硫化，可在 2~8℃ 保存 24 小时，避免冷冻提取的 DNA。

2. DNA 的硫化

2.1 实验前试剂准备

硫化试剂溶液制备：加入 1mL 纯化水，室温旋转振荡 10 分钟，至粉末完全溶解。如有必要，可在 50℃ 水浴中加热使其溶解。

2.2 硫化操作步骤如下

- 1) 硫化体系：取一新的 600μL 离心管，加入 100μL DNA 溶液，加入 190μL 硫化试剂溶液，再加入 30μL DNA 保护液，混匀后瞬离。
- 2) 硫化条件如下：
第一步：98℃ 加热 10 分钟；
第二步：80℃ 加热 1 小时。

注：硫化后的 bisDNA（Bisulfite conversion DNA）若不立刻进行纯化回收，可在室温（15~30℃）保存 20 小时。

3. bisDNA（Bisulfite conversion DNA）的纯化回收

3.1 实验前试剂准备：

- 1) 纯化漂洗液 1：加入 48mL 无水乙醇，得到 60mL 使用体积。
- 2) 纯化漂洗液 2：使用前加入 16mL 无水乙醇，得到 20mL 的使用体积。
- 3) 纯化漂洗液 3：使用前加入 16mL 无水乙醇，得到 20mL 的使用体积。

3.2 纯化步骤如下：

- 1) 取一个新的 2mL 的离心管，加入 1.2mL 的结合液，再加入上述的硫化产物（约 320μL），涡旋振荡 15 秒，瞬离。
- 2) 将磁珠振荡混匀，加入 20μL 磁珠，涡旋振荡混匀，室温旋转振荡 20 分钟。
- 3) 将离心管放置在磁力架上 1 分钟，磁珠完全吸附后，弃去上清。
- 4) 加入 500μL 纯化漂洗液 1，涡旋混匀 10 秒。
- 5) 将离心管放置在磁力架上 1 分钟，磁珠完全吸附后，弃去上清。
- 6) 加入 500μL 纯化漂洗液 2，涡旋混匀 10 秒后，室温颠倒混匀，孵育 10~20 分钟。
- 7) 将离心管放置在磁力架上 1 分钟，磁珠完全吸附后，弃去上清。
- 8) 加入 500μL 纯化漂洗液 3，涡旋混匀 10 秒。
- 9) 将离心管放置在磁力架上 1 分钟，磁珠完全吸附后，弃去上清。
- 10) 加入 500μL 纯化漂洗液 1，涡旋混匀 10 秒。
- 11) 将离心管放置在磁力架上 1 分钟，磁珠完全吸附后，弃去上清。
- 12) 重复步骤 10)~11)。
- 13) 用 20~200μL 移液器将残留液体吸干，自然干燥 10 分钟。
- 14) 向离心管中加入 60μL 预热到 80℃ 的洗脱液，充分混匀后 80℃ 孵育 10 分钟（中间再混一次）。
- 15) 瞬离后，将离心管置于磁力架上，磁珠完全吸附后，吸取纯净上清至新的离心管。弃去含有磁珠的离心管。

注：纯化好的 bisDNA 若不立刻进行 PCR 检测，在 2~8℃ 保存可保存 24 小时，在 -25~-15℃ 保存 4 天。

4. PCR 检测

- 4.1 将试剂盒组分 PCR 反应液插入冰盒中或置于 4℃ 冰箱中，自然融化。
- 4.2 将 DNA 聚合酶和纯化水微离心后置于冰上。
- 4.3 按照表 5 的反应体系，配制混合液，每个总反应体积为 30μL。其中 PCR 反应液和 DNA 聚合酶配制混合液，样品、质控品和纯化水分别加入。

表 5 配液组分表

加入组分	体积	说 明
PCR反应液	14.7μL	×（反应数+损耗）
DNA聚合酶	0.3μL	×（反应数+损耗）
样品DNA /质控品/纯化水	15μL	分别加入14.7μL PCR反应液 + 0.3μL DNA聚合酶

总体积	30 μ L	+15 μ L模板
-----	------------	---------------

- 4.4 根据待测样品数量和检测位点设计加样布局，并计算需要的反应数和预计损耗量，推荐布局见表 6。
- 4.5 根据实验布局（见表 6）将反应混合液（见表 5）依次对应加入八联管或 96 孔板中，每孔加入 15 μ L，然后对应加入样品 DNA、质控品和纯化水 15 μ L，小心盖上八联管管盖或 96 孔板膜。振荡混匀，离心上机。

表 6 PCR 仪加样推荐布局

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC	PC	PC	S7	S7	S7						
B	NC	NC	NC	S8	S8	S8						
C	S1	S1	S1	S9	S9	S9						
D	S2	S2	S2	S...	S...	S...						
E	S3	S3	S3	NTC	NTC	NTC						
F	S4	S4	S4									
G	S5	S5	S5									
H	S6	S6	S6									

注：PC: Positive Control, 阳性质控品；NC: Negative Control, 阴性质控品；NTC: No Template Control, 无模板对照；S: Sample, 检测样品。

- 4.6 按照表 7 指示设置反应程序（首次设置程序应保存为模板程序），样品上机后，保存实验名称，运行 PCR 反应，并及时根据实验布局编写加样排版和样品名称。

表 7 PCR 反应程序

反应过程	循环数	温度(℃)	时间	升降温速率 (℃/秒)	采集荧光
变性	1	95	0:05:00	4.4	无
循环	50	62	0:00:05	1.3	无
		56	0:00:35	1.3	羧基荧光素 (FAM) / 六氯荧光素 (HEX)
		94	0:00:20	1.3	无
冷却	1	40	0:00:30	2.2	无

5. 分析 PCR 结果，得出 ACTB 和 septin9 的 CP 值

PCR 运行结束以后，按照以下设置要求，在 LightCycler® 480 上进行 septin9/ACTB 的 CP 值分析。

- 5.1 在 LightCycler® 480 基本软件模块栏中选择“Analysis Overview”。
- 5.2 选择“Abs Quant/Fit Points”分析模式。
- 5.3 选择“Filter Comb 465 – 510”。
- 5.4 选择“Cycle Range”窗口，设定“First Cycle”为“1”；“Last Cycle”为“50”。
- 5.5 在“Cycle Range”窗口中，将背景设定为“5-22”，点击蓝色的“background”按钮，将“Min Offset”设定为“4”，将“Max Offset”设定为“21”。
- 5.6 选择“Noise Band”窗口，将“noise band”设定为“Noise Band (Fluoresc)”，并将“noise band”的值手动地改为“2.0”。
- 5.7 选择“Analysis”窗口，选择“Threshold (Manual)”，将“threshold”设定为“2.0”，将“Fit Points”设定为“2”。

5.8 点击“Calculate”，样品的septin9的CP值将会被自动计算。

5.9 选择“Filter Comb 533 – 580”。

5.10 点击“Calculate”，样品的ACTB的CP值将会被自动计算。

注意：调整“Noise Band”和“Threshold”使其稍微高于背景，并且与扩增曲线的指数增长初期相交。没有明显的指数增长期的扩增曲线判为阴性。列举了3种调整基线的情况，见图1。

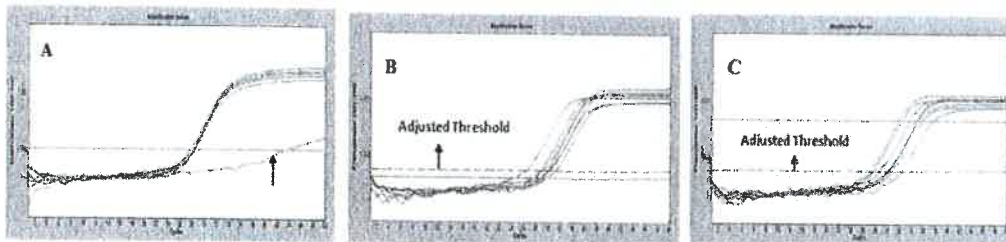


图1：在480上扩增的截图。A：没有明显的指数增长期的扩增曲线应定义为阴性。B：调整“Threshold”，使其稍高于背景。C：调整“Threshold”，使其与扩增曲线的指数增长初期相交。

【检验结果的解释】

1. 运行无模板对照（NTC）的扩增曲线分析，应无扩增曲线升起，说明实验无污染，可以继续分析。
2. 质控品的内参基因（ACTB）应均有扩增信号，且呈 S 型扩增曲线趋势，内参 CP 值应符合表 8；阴性质控品的 septin9 应无扩增曲线升起，阳性质控品的 septin9 基因有扩增信号，且呈 S 型扩增曲线趋势，同时 CP 值应符合表 8。质控品检测满足以上条件时，证明实验有效，可继续分析。

表 8 质控品的参数范围

质控品	反应	septin9,CP	ACTB,CP
阳性质控品	PCR1	CP≤40.0	CP≤40.0
	PCR2	CP≤40.0	CP≤40.0
	PCR3	CP≤40.0	CP≤40.0
阴性质控品	PCR1	无扩增	CP≤40.0
	PCR2	无扩增	CP≤40.0
	PCR3	无扩增	CP≤40.0

3. 样品的内参基因应均有扩增信号，且呈 S 型扩增曲线趋势，样品单个 PCR 检测结果应按照表 9 判读。

表 9 样品检测-单个 PCR 结果判读

样品单个 PCR 结果	septin9	ACTB
阳性	CP≤47.93；有扩增信号，且呈 S 型扩增曲线趋势	CP<40.21
阴性	无扩增	CP<40.21
实验无效	任何结果	CP≥40.21

样品的 3 个平行的检测结果应按照表 10 进行综合判读。

表 10 样品检测-3 个平行 PCR 综合判读

样品检测结果	质控品和无模板对照	3 个 PCR 检测结果综合判读
--------	-----------	------------------

阳性	有效	至少 1 个反应阳性
阴性	有效	无反应阳性
实验无效	无效	任何结果

4. 不符合 1、2 项要求，建议重新检测；不符合 3 项中样品有效的要求，建议重新提取 DNA，重新硫化，再次检测。

【检验方法的局限性】

1. 该试剂盒仅用于对结直肠癌疑似患者 septin9 基因甲基化状态的检测，其检测结果仅供临床参考，不应作为患者确诊的依据，临床医生应结合其它诊断结果对检测结果进行综合判断。
2. 阴性结果不能完全排除靶基因甲基化状态的存在，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. 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。
4. 该检测仅限于规定的血液样本类型及检测系统（适用机型：Roche LightCycler® 480）。

【产品性能指标】

1. 外观和性状：试剂盒各组分应齐全、完整、液体无渗漏。磁珠上层为澄清液体，下层为黑色沉淀物；PCR 反应液为红色澄清液体；其余液体组分应澄清，无沉淀、无悬浮物、无絮状物。中文包装标签应清晰、准确、牢固。
2. 提取、硫化纯化效率：对强阳提取参考品进行提取、硫化纯化，经荧光 PCR 检测其为阳性；对弱阳提取参考品进行提取、硫化纯化，经荧光 PCR 检测其为阳性。
3. 准确性：检测准确性参考品，阳性符合率应为 100%。
4. 特异性：检测特异性参考品，阴性符合率应为 100%。
5. 灵敏度：在 10ng/mL 野生型基因组 DNA 背景下，对 septin9 甲基化 DNA 含量为 0.1% 的灵敏度参考品能够准确检出；在 septin9 甲基化 DNA 含量为 1% 背景下，对 DNA 浓度为 1ng/mL 的灵敏度参考品能够准确检出。
6. 精密性：对同一份强阳精密性参考品重复检测 10 次，阳性检出率为 100%，且 $CV \leq 5\%$ ；对同一份弱阳精密性参考品重复检测 10 次，阳性检出率为 100%，且 $CV \leq 5\%$ 。
7. 效期稳定性：取到期后的产品检测，应符合 1~6 的要求。
8. 抗干扰能力：样本中含以下干扰物质：胆红素（ $\leq 0.4\text{mg/mL}$ ）、胆固醇（ $\leq 12\text{mg/mL}$ ）、甘油三酯（ $\leq 20\text{mg/mL}$ ）、葡萄糖（ $\leq 10\text{mg/mL}$ ）、尿酸（ $\leq 0.35\text{mg/mL}$ ）、K2EDTA（ $\leq 20\text{mg/mL}$ ）、白蛋白（ $\leq 50\text{mg/mL}$ ）、血清铁蛋白（ $\leq 2\text{mg/mL}$ ）、血红蛋白（ $\leq 17.5\text{mg/mL}$ ）、未甲基化 DNA（ $\leq 500\text{ng/mL}$ ），对本试剂盒的检测结果无影响。
9. 临床诊断敏感度和特异度
以肠镜、病理等临床诊断为金标准，其中不同分期的结直肠癌为阳性组（共计 586 例），非结直肠癌为阴性组（共计 744 例）。其中正常人 215 例，肠良性疾病 198 例（息肉 65 例、腺瘤 37 例，其它 96 例），其它癌症 255 例（胃癌 100 例、食道癌 42 例，肺癌 33 例，其它 80 例），干扰样本 76 例。
试剂盒与金标准对比结果如下：
 - 1) 结直肠癌 586 例，检测阳性 448 例，敏感度为 76.45%（CI 95%：72.80%—79.83%）。
 - 2) 非结直肠癌 744 例，检测阳性 72 例，特异度为 90.32%（CI 95%：87.97%—92.35%）。

- ①正常人 215 例，检测阳性 6 例，特异度为 97.21%（CI 95%：94.03%—98.97%）。
- ②肠良性疾病 198 例，检测阳性 26 例（息肉 3 例，腺瘤 9 例，其它肠道疾病 14 例），特异度为 86.87%（CI 95%：81.35%—91.24%）。
- ③其它癌症 255 例，检测阳性 39 例（胃癌 20 例、食道癌 7 例，肺癌 2 例，其它 10 例），特异度为 84.71%（CI 95%：79.69%—88.89%）。
- ④干扰样本 76 例，检测阳性 1 例，特异度为 98.68%（CI 95%：92.89%—99.97%）。

【注意事项】

1. 在实验前，应详细阅读本说明。
2. 应由具备专业经验或经培训合格的人员进行操作。
3. 检测结果会受到样品本身的来源、样品采集过程、样品质量、样品运输条件、样品预处理等因素影响，同时也受到核酸提取质量、荧光定量 PCR 仪型号、操作环境以及当前分子生物学技术的局限性等限制，由此，可能导致极少数样品得出假阳性或假阴性的检测结果。使用者须了解检测过程中可能存在的潜在错误及准确性的局限性。
4. 试剂管内试剂在使用前应充分融化、混匀、离心，使液体集中在试剂管底部。
5. 本试剂盒所有试剂均经过特别配制，以用于上述检测。随意替换试剂盒中的任何试剂，都可能影响使用效果。不同批号试剂盒成分不可相互混用。
6. 实验室应按试剂准备区、样品处理区、反应液配制区、扩增检测分析区分隔使用。操作过程应将工作服、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。
7. 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。
8. 实验过程中若出现样品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。
9. 不要使用超过有效期的试剂。避免在不必要的情况下冻融试剂盒中的试剂。
10. 本试剂盒检测结果只能运用于肿瘤的辅助诊断，医师在对肿瘤的诊断不能单一依靠 septin9 基因甲基化状态。

【参考文献】

- 1 Timothy Robert Church. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. Gut,2014,63:317-325.
- 2 Jorja D Warren. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. BMC Medicine.2011,9:133.
- 3 Theo deVos. Circulating Methylated SEPT9 DNA in Plasma Is a Biomarker for Colorectal Cancer. Clinical Chemistry.2009,55(7):1337-1346.
- 4 Robert Gru tzmann. Sensitive Detection of Colorectal Cancer in Peripheral Blood by Septin 9 DNA Methylation Assay. Plosone.2008,3(11):3759.
- 5 Vera Schellerer. Assessment of the clinical utility of an improved blood-based Septin9 test for early detection of CRC in patients with co-morbidities. Universitätsklinikum Erlangen,Chirurgische Klinik, Krankenhausstrasse 12, 91054 Erlangen.2012.
- 6 Michael Scott. Multimodality expression profiling shows SEPT9 to be overexpressed in a wide range of human tumours. Oncogene .2005,24:4688-4700.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：苏州工业园区为真生物医药科技有限公司

住所：苏州工业园区星湖街 218 号生物纳米园 C4 楼 201、301 室

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址：苏州工业园区娄葑镇新庆街 68 号 2 幢 2 层、3 层

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准日期及修改日期】

中华人民共和国
医疗器械变更注册（备案）文件
（体外诊断试剂）

注册证编号：国械注准20183400103

产品名称	人septin9基因甲基化检测试剂盒（荧光PCR法）
变更内容	1. 产品储存条件及有效期的变更，具体内容见附件； 2. 适用机型的变更，具体内容见附件； 3. 产品技术要求和说明书中文字的修改，具体内容见附件。 请注册人依据变更批件及附件自行修订相关内容。
备注	本文件与“国械注准20183400103”注册证共同使用。

审批部门：国家药品监督管理局

批准日期：二〇二二年五月十七日



产品说明书变化对比表

原条款及内容

变更后条款及内容

此文件由采购人或注册人提供

【储存条件及有效期】

- 1. 试剂盒有效期 6 个月。

【储存条件及有效期】

- 1. 试剂盒有效期 12 个月。

【适用仪器】

Roche LightCycler® 480。

【适用仪器】

Roche LightCycler® 480; Applied Biosystems 7500 PCR 仪; SLAN-96S 荧光定量 PCR 仪

4.6 按照表 7 指示设置反应程序（首次设置程序应保存为模板程序），样品上机后，保存实验名称，运行 PCR 反应。并及时根据实验布局编写加样排板和样品名称。

按照表 7 指示设置反应程序（首次设置程序应保存为模板程序），样品上机后，保存实验名称，运行 PCR 反应。并及时根据实验布局编写加样排板和样品名称。

表 7 PCR 反应程序

反应过程	循环数	温度(°C)	时间	升降温速率 (°C/秒)	采集荧光
变性	1	95	0:05:00	4.4	无
		62	0:00:05	1.3	无
		56	0:00:35	1.3	羧基荧光素 (FAM) / 六氟荧光素 (HEX)
		94	0:00:20	1.3	无
冷却	1	40	0:00:30	2.2	无



表 7 PCR 反应程序

反应过程	循环数	温度(°C)	时间	升降温速率 (°C/秒)	采集荧光
变性	1	95	0:05:00	4.4	无
		62	0:00:05	1.3	无
		56	0:00:35	1.3	羧基荧光素 (FAM) / 六氟荧光素 (HEX)
		94	0:00:20	1.3	无
冷却	1	40	0:00:30	2.2	无

5. 分析 PCR 结果，得出 ACTB 和 septin9 的 Cp 值

PCR 运行结束以后，按照以下设置要求，在 LightCycler® 480 上进行 septin9/ACTB 的 Cp 值分析。

5.2 分析 PCR 结果，得出 ACTB 和 septin9 的 Cp 值

PCR 运行结束以后，按照以下设置要求，在 LightCycler® 480 上进行 septin9/ACTB 的 Cp 值分析。

- 5.1 在 LightCycler® 480 基本软件模块栏中选择“Analysis Overview”。
- 5.2 选择“Abs Quant/Fit Points”分析模式。
- 5.3 选择“Filter Comb 465 – 510”。
- 5.4 选择“Cycle Range”窗口，设定“First Cycle”为“1”；“Last Cycle”为“50”。
- 5.5 在“Cycle Range”窗口中，将背景设定为“5-22”，点击蓝色的“background”按钮，将“Min Offset”设定为“4”，将“Max Offset”设定为“21”。
- 5.6 选择“Noise Band”窗口，将“noise band”设定为“Noise Band (Fluoresce)”，并将“noise band”的值手动地改为“2.0”。

- 1) 在 LightCycler® 480 基本软件模块栏中选择“Analysis Overview”。
- 2) 选择“Abs Quant/Fit Points”分析模式。
- 3) 选择“Filter Comb 465 – 510”。
- 4) 选择“Cycle Range”窗口，设定“First Cycle”为“1”；“Last Cycle”为“50”。
- 5) 在“Cycle Range”窗口中，将背景设定为“5-22”，点击蓝色的“background”按钮，将“Min Offset”设定为“4”，将“Max Offset”设定为“21”。
- 6) 选择“Noise Band”窗口，将“noise band”设定为“Noise Band (Fluoresce)”，并将“noise band”的值手动地改为“2.0”。

5.7 选择“Analysis”窗口，选择“Threshold (Manual)”，将“threshold”设定为“2.0”，将“Fit Points”设定为“2”。

5.8 点击“Calculate”，样品的sepin9的Cp值将会被自动计算。

5.9 选择“Filter Comb 533 - 580”。

5.10 点击“Calculate”，样品的ACTB的Cp值将会被自动计算。

注意：调整“Noise Band”和“Threshold”使其稍微高于背景，并且与扩增曲线的指数增长初期相交。没有明显的指数增长长期的扩增曲线判为阴性。列举了3种调整基线的情况，见图1。



图1：在480上扩增的截图。A：没有明显的指数增长长期的扩增曲线应定义为阴性。B：调整“Threshold”，使其稍高于背景。C：调整“Threshold”，使其与扩增曲线的指数增长初期相交。

7) 选择“Analysis”窗口，选择“Threshold (Manual)”，将“threshold”设定为“2.0”，将“Fit Points”设定为“2”。

8) 点击“Calculate”，样品的sepin9的Cp值将会被自动计算。

9) 选择“Filter Comb 533 - 580”。

10) 点击“Calculate”，样品的ACTB的Cp值将会被自动计算。

注意：调整“Noise Band”和“Threshold”使其稍微高于背景，并且与扩增曲线的指数增长初期相交。没有明显的指数增长长期的扩增曲线判为阴性。列举了3种调整基线的情况，见图1。



图1：在480上扩增的截图。A：没有明显的指数增长长期的扩增曲线应定义为阴性。B：调整“Threshold”，使其稍高于背景。C：调整“Threshold”，使其与扩增曲线的指数增长初期相交。

6. Applied Biosystems 7500 PCR 仪上机

6.1 反应程序的设置

PCR 反应混合液中不包含 ROX 或其他染料，故“Passive Reference”选择“None”。sepin9 选择 FAM 通道，ACTB 选择 VIC (同 HEX) 通道。按照表 8 设置反应程序（首次设置程序应保存为模板程序），样品上机后，保存实验名称，运行 PCR 反应。并及时根据实验布局编写加样排版和样品名称。

表 8: ABI 7500 PCR 反应程序

反应过程	循环数	温度(°C)	时间	升降温速率 (%)	采集荧光
变性	1	95	0:05:00	100	无
		62	0:00:05	30	无
		56	0:00:35	30	√
循环	50	94	0:00:20	100	无
		40	0:00:30	10	无
冷却	1				



注：√代表采集荧光阶段。

6.2 分析 PCR 结果，得出 ACTB 和 septin9 的 Ct 值

PCR 运行结束以后，按照以下设置要求，在 ABI 7500 PCR 仪上进行 septin9/ACTB 的 Ct 值分析。

- 1、选择 “Analysis ”，然后选择“Multicomponent Plot”
- 2、设置 septin9 通道（FAM 通道）如下：
1)点击右上角“Analysis Setting”进行设置，窗口左边 Select a target 中的 Target 选择 FAM，设置 Threshold 为 50000，Baseline Start Cycle 为 10，End Cycle 为 22。
2) 点击 “Analyze”，样品 septin9 的 Ct 值将会被自动计算。
- 3、设置 ACTB 通道（HEX 通道）如下：
1)点击右上角“Analysis Setting”进行设置，窗口左边 Select a target 中的 Target 选择 HEX，设置 Threshold 为 25000，Baseline Start Cycle 为 10，End Cycle 为 22。
2) 点击 “Analyze”，样品 ACTB 的 Ct 值将会被自动计算。

7. SLAN-96S 荧光定量 PCR 仪上机

7.1 反应程序的设置

septin9 选择 FAM 通道（激发发射波长为 470-510nm），ACTB 选择 HEX 通道（激发发射波长为 530-565nm）。按照表 9 设置反应程序（首次设置程序应保存为模板程序），样品上机后，保存实验名称，运行 PCR 反应。并及时根据实验布局编写加样排版和样品名称。

表 9: SLAN-96S PCR 反应程序

反应过程	循环数	温度(°C)	时间	升降温速率 (°C/秒)	采集荧光
变性	1	95	0:05:00	4.4	无
		62	0:00:05	1.3	无
		56	0:00:35	1.3	√
循环	50	94	0:00:20	1.3	无
		40	0:00:30	2.2	无
冷却	1				

注：√代表采集荧光阶段。

7.2 分析 PCR 结果，得出 ACTB 和 septin9 的 Ct 值

- 1) 点击“分析”，系统自动计算样品的 septin9 和 ACTB 的 Ct 值。

【检验方法的局限性】

4.该检测仅限于规定的血液样本类型及检测系统（适用机型：Roche LightCycler® 480）。

【检验方法的局限性】

4.该检测仅限于规定的血液样本类型及检测系统（适用机型：Roche LightCycler® 480: Applied Biosystems 7500 PCR 仪；SLAN-96S 荧光定量 PCR 仪）。

产品技术要求变化对比表

原条款及内容	变更后条款及内容
2.7 稳定性	2.7.1 效期稳定性：本产品有效期6个月。取到期后的样品检测，应符合2.1~2.6的要求。
2.7.1 效期稳定性：本产品有效期6个月。取到期后的样品检测，应符合2.1~2.6的要求。	2.7.1 效期稳定性：本产品有效期12个月。取到期后的样品检测，应符合2.1~2.6的要求。