

受理号：CSZ2400489

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：人 SCT、HOXA7、SHOX2 基因甲基化

检测试剂盒（荧光 PCR 法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：苏州呼呼健康科技有限公司

国家药品监督管理局

医疗器械技术审评中心

目 录

基本信息.....	3
一、申请人名称.....	3
二、申请人住所.....	3
三、生产地址.....	3
技术审评概述.....	4
一、产品概述.....	4
二、临床前研究概述	6
三、临床评价概述.....	11
四、产品受益风险判定.....	12
综合评价意见.....	14

基本信息

一、申请人名称

苏州呼呼健康科技有限公司

二、申请人住所

苏州工业园区星湖街 218 号 B2-305 单元

三、生产地址

苏州工业园区星湖街 218 号 B2-305、307、A2-330 单元

技术审评概述

一、产品概述

（一）产品主要组成成分

检测试剂由 DNA 聚合酶、PCR 反应液、阳性质控品和阴性质控品组成，具体见下表。

序号	组分名称	规格	数量	主要成分
1	DNA 聚合酶	15 μ L/管	1 管	热启动 Taq DNA 聚合酶
2	PCR 反应液	550 μ L/管	1 管	引物、荧光标记探针、脱氧核糖核苷三磷酸（包括 dATP、dGTP、dTTP 和 dCTP）、氯化镁
3	阳性质控品	20 μ L/管	1 管	CpG 甲基化人基因组 DNA
4	阴性质控品	15 μ L/管	1 管	人基因组 DNA

说明：不同批号试剂盒中各组分不可互换使用。

（二）产品预期用途

本试剂盒用于体外定性检测人支气管镜刷检样本中 SCT、HOXA7、SHOX2 基因甲基化。

本产品用于肺部影像学高度怀疑肺部恶性肿瘤、医生建议做支气管镜检查且常规支气管镜不容易获得活检组织的肺癌疑似人群的辅助诊断。

本产品检测结果仅作为辅助诊断供临床医生参考，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。

（三）产品包装规格

24 人份/盒。

（四）产品检验原理

DNA 的甲基化修饰指 CpG 二核苷酸中胞嘧啶的 5 位碳原子加上一个甲基基团形成 5 甲基胞嘧啶，人基因组 DNA 使用亚硫酸盐处理后，亚硫酸盐可以使非甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶，在 PCR 扩增过程中尿嘧啶再转换为胸腺嘧啶，而甲基化的胞嘧啶保持不变，利用本原理和荧光 PCR 技术针对甲基化的基因序列设计特异性引物和 TaqMan®探针来区分甲基化和未甲基化的基因。

本试剂盒分别针对人 SCT、HOXA7、SHOX2 基因甲基化序列，设计引物和 TaqMan®探针来区分甲基化和未甲基化的 SCT、HOXA7 和 SHOX2 基因；另外本试剂盒采用多重多色荧光 PCR 方法，设计不同荧光标记的 TaqMan®探针在同一反应管中区分 SCT、HOXA7 和 SHOX2 基因，其中 VIC 荧光检测 SCT 基因甲基化 DNA 状态，ROX 荧光检测 HOXA7 基因甲基化 DNA 状态，FAM 荧光检测 SHOX2 基因甲基化 DNA 状态；同时针对

内参 ACTB 基因设计了引物和 TaqMan® 探针，利用 CY5 荧光检测内参 ACTB 基因，监控人支气管镜刷检样本的质量及人基因组 DNA 纯化过程。

二、临床前研究概述

（一）主要原材料

1. 主要原材料的选择

本产品的主要原材料包括引物、探针、Taq DNA 聚合酶、dNTP、CpG 甲基化人基因组 DNA 和人基因组 DNA。这些原料均是通过外购的方式获得。其中引物、探针的序列均由申请人自行设计，由合成公司经过合成、修饰、纯化方式获得；Taq DNA 聚合酶由供应商克隆表达后获得；dNTP 由供应商化学合成获得；CpG 甲基化人基因组 DNA 由供应商提取修饰纯化后获得；人基因组 DNA 由供应商提取纯化获得。

申请人对主要原材料进行了供应商的选择，通过功能性实验筛选出合格供应商，制定了各主要原材料的质量标准并经检验合格。

2. 企业参考品和质控品设置情况

本产品的企业参考品包括阳性参考品、阴性参考品、精密度参考品和检出限参考品，组成如下：

阳性参考品包括 12 个，分别命名为 SSH-P1 ~ P12，其中阳

性参考品 SSH-P1~P3 为不同 DNA 浓度下 CpG 甲基化人基因组 DNA 样本；阳性参考品 SSH-P4~P6 分别为 SCT、HOXA7、SHOX2 单基因甲基化 DNA 样本；阳性参考品 SSH-P7~P9 分别为 SCT、HOXA7、SHOX2 任意两个基因甲基化组合的 DNA 样本；阳性参考品 SSH-P10~P12 为一定 DNA 浓度下，不同甲基化比例的人基因组 DNA 样本。

阴性参考品包括 8 个，分别命名为 SSH-N1~N8，其中阴性参考品 SSH-N1~N3 为含有外源性干扰物质的非甲基化人基因组 DNA 样本；阴性参考品 SSH-N4 为非甲基化人基因组 DNA 样本；阴性参考品 SSH-N5~N6 为其他常见甲基化基因阳性样本；阴性参考品 SSH-N7~N8 为含有内源性干扰物质的非甲基化人基因组 DNA 样本。

精密度参考品包括 4 个，分别命名为 SSH-J1~J4，包含不同 DNA 浓度和不同甲基化比例的 DNA 样本。

检出限参考品包括 1 个，命名为 SSH-L，为最低可检出浓度和甲基化比例的 DNA 样本。

本试剂盒同时还设置了阳性质控品和阴性质控品，用于检测过程中的质量控制。

（二）生产工艺及反应体系研究

申请人对试剂盒反应体系的研究包括对 Taq DNA 聚合酶、

dNTP、PCR 模板、引物、探针等组分的用量进行优化；对退火温度、退火时间及扩增循环数进行优化；确定了支气管镜刷检样本的洗脱体积、核酸提取后 DNA 浓度、亚硫酸盐修饰 DNA 样本量和洗脱体积；并对该产品三种适用机型 ABI 7500、ABI 7500 Fast DX、Roche LightCycler480 实时荧光定量 PCR 仪的分析条件进行了研究。通过功能性实验，最终确定了最佳的反应体系。

申请人进行了核酸提取试剂及亚硫酸盐转化试剂的性能研究，结果表明配合使用的核酸提取试剂及亚硫酸盐转化试剂的性能符合要求。

申请人根据试剂盒中试剂及组分的主要生产工艺的研究结果，确定了最佳的生产工艺。

（三）分析性能评估

本产品分析性能评估内容包括准确度、精密度、检出限、分析特异性（交叉反应和干扰研究）。

准确度研究中，申请人在三种适用机型上，分别使用三批次试剂盒对阳性参考品和阴性参考品进行检测，检测结果显示阳性参考品符合率、阴性参考品符合率均为 100%。同时使用临床样本对试剂盒准确性进行了研究，阳性样本包括临床诊断为不同分期的鳞癌、腺癌、肺大细胞癌和肺小细胞癌，阴性样本包括

临床诊断为肺结核、真菌感染、结节病、肺纤维化等样本。将试剂盒检测结果与临床诊断进行比对分析，结果显示检测结果与临床诊断一致。

精密度研究中，申请人通过不同批次、机型、人员、轮次、日间和批次对弱阳性以及阴性样本进行连续 20 天的检测，本试剂盒检测结果的 Ct 值变异系数（重复性、室内精密度和再现性 CV）均不大于 5%。

检出限研究中，在适用机型上分别进行确定及验证。以临床诊断为肺结节的阴性样本 DNA 为基质，采用不同浓度、不同甲基化比例的梯度稀释 DNA 样本，使用三个批次的试剂盒分别对每个浓度梯度的样本检测 20 次进行检出限的确定。然后采用多例检出限浓度水平的临床样本进行验证。确定产品最终检出限为：4ng/μL DNA 浓度下检测出不低于 10% 的基因甲基化。

交叉反应的研究结果表明，试剂盒对于常见感染性微生物基因组 DNA 无交叉反应，RASSF1A 甲基化 DNA、PTGER4 甲基化 DNA、胃癌、肝癌、乳腺癌、结直肠癌等无交叉反应，肺结核、肺炎、肺部感染、肺结节、肺纤维病变等常见的肺癌影像鉴别诊断类疾病的综合特异度大于 90%。

干扰研究的结果表明，样本中含有以下浓度的内源及外源干扰物：粘蛋白(2.5%)、血红蛋白(2g/L)、甘油三酯(37mmol/L)、

胆红素（342 μ mol/L）、生理盐水鼻喷雾剂（1%）、糠酸莫米松乳膏（5 μ g/mL）、布地奈德鼻喷雾剂（1%）、复方薄荷脑软膏（7.5mg/mL）、磷酸奥司他韦（7.5mg/mL）、阿奇霉素分散片（10mg/mL）、妥布霉素滴眼液（0.6mg/mL）、血清白蛋白（40mg/mL）、胆固醇（5mg/mL）、尿酸（0.235mg/mL）、葡萄糖（10mg/mL）、未甲基化基因组 DNA（100ng/ μ L）、布洛芬（1.07mg/mL）、对乙酰氨基酚（1mg/mL）、头孢（0.27mg/mL）、吉非替尼（0.25mg/mL）、替吉奥（0.95mg/mL）、昂丹司琼（0.24mg/mL），对试剂盒检测结果均无影响。

（四）阳性判断值研究

本产品阳性判断值的研究采用临床来源的支气管镜刷检样本，包括阳性判断值的初步确定和验证两部分研究。采用本试剂盒对 143 例支气管镜刷检样本进行检测，包括临床诊断确诊为肺癌患者样本 72 例，肺炎、结节病、肺结核、支气管扩张等非肺癌患者样本 71 例，通过比较三基因 logic 回归分析、不同临界值组合的检测性能，确定阳性判断值。并采用临床样本进行阳性判断值验证研究，性能数据结果一致。

最后确定 ACTB 基因的 Ct 值 $\leq$ 36 时，SCT 基因 Ct 值 $\leq$ 36 时，判断 SCT 基因甲基化为阳性；HOXA7 基因 Ct 值 $\leq$ 45 时，判断 HOXA7 基因甲基化为阳性；SHOX2 基因 Ct 值 $\leq$ 40 时，

判断 SHOX2 基因甲基化为阳性。

(五) 稳定性研究

申请人对本产品的稳定性研究包括实时稳定性、运输稳定性、使用稳定性(包括开瓶稳定性、冻融稳定性)及样本稳定性。

实时稳定性研究: 采用三批次试剂于 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下保存, 分别在第 0、2、3、6、8 个月, 使用企业参考品进行了阳性符合率、阴性符合率、精密度和检出限研究, 结果均符合要求。确定试剂盒于 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下存储, 有效期为 6 个月。

此外, 申请人对产品的运输稳定性、使用稳定性和样本稳定性分别进行了研究。结果显示产品的性能均能满足产品说明书的声称。

三、临床评价概述

申请人在复旦大学附属中山医院、上海市胸科医院、浙江大学医学院附属第一医院共三家临床机构进行临床试验。采用试验体外诊断试剂分别与临床参考标准和实验室参考方法进行比较研究, 确认本产品的临床性能。其中, 肺癌和其他肿瘤病例采用病理诊断确诊, 其他疾病根据相关诊疗指南综合诊断确诊。入组病例为肺部影像学高度怀疑肺部恶性肿瘤, 医生建议做支气管镜检查且常规支气管镜不容易获得活检组织的疑似肺癌患者, 样本类型为支气管镜刷检样本。

针对与临床参考标准的比较研究，共纳入临床有效病例 1086 例，其中肺癌病例 664 例（覆盖肺癌所有分期及病理分型），非肺癌的其他病例 422 例（包括其他易产生干扰的肿瘤及各种良性疾病病例），试验结果显示，本产品针对肺癌的临床灵敏度为 87.8%（95%CI: 85.09%，90.08%），临床特异度为 95.02%（95%CI: 92.51%，96.72%）。临床性能满足临床需求。

与实验室参考方法（Sanger 测序）的比较研究共纳入 227 例肺癌疑似病例，试验结果显示：针对 SCT 基因，阳性符合率为 100%（95%CI: 94.87%，100%），阴性符合率为 100%（95%CI: 97.6%，100%）；针对 HOXA7 基因，阳性符合率为 100%（95%CI: 96.37%，100%），阴性符合率为 99.2%（95%CI: 95.61%，99.86%）；针对 SHOX2 基因，阳性符合率为 98.85%（95%CI: 93.77%，99.8%），阴性符合率为 100%（95%CI: 97.33%，100%）。上述结果显示两者之间具有良好的一致性。

综上所述，临床试验结果显示本产品的临床性能满足技术审评要求。

四、产品受益风险判定

根据 GB/T 42062-2022《医疗器械－风险管理对医疗器械的应用》对产品进行风险分析。

（一）受益评估

本产品用于体外定性检测人支气管镜刷检样本中 SCT、HOXA7 和 SHOX2 基因甲基化。本产品用于肺部影像学高度怀疑肺部恶性肿瘤、医生建议做支气管镜检查且常规支气管镜不容易获得活检组织的肺癌疑似人群的辅助诊断。检测结果不能作为确诊的依据，应结合临床其他检测综合判定。

（二）风险评估

申请人对已知危险进行风险评价，按照风险可接受准则判断每个危险的风险是否达到可接受水平，对合理可行降低的风险，不经过风险/收益分析既判定为不可接受的风险采取控制措施，并对具体措施进行实施验证，同时重新对采取措施后的风险进行估计，确认其风险水平可接受。本产品上市带来的获益大于风险，但为保证用械安全，基于对主要剩余风险的规避，需要在说明书中提示以下信息：

警示及注意事项：产品说明中介绍了该产品检验方法的局限性及使用中的注意事项。

综合评价意见

本申报项目为境内第三类体外诊断试剂产品注册。依据《医疗器械监督管理条例》（国务院令第 739 号）、《体外诊断试剂注册与备案管理办法》（国家市场监督管理总局令第 48 号）等相关医疗器械法规与配套规章，经对申请人提交的注册申报资料进行系统评价，申报产品符合安全性、有效性的要求，符合现有认知水平，建议准予注册。

2026 年 5 月 14 日

附件：产品说明书

人 SCT、HOXA7、SHOX2 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 SCT、HOXA7、SHOX2 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

24 人份/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测人支气管镜刷检样本中 SCT、HOXA7 和 SHOX2 基因甲基化。

本产品用于肺部影像学高度怀疑肺部恶性肿瘤、医生建议做支气管镜检查且常规支气管镜不容易获得活检组织的肺癌疑似人群的辅助诊断。

本产品检测结果仅作为辅助诊断供临床医生参考，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。

人基因组 DNA 甲基化（methylation）是一种不改变 DNA 序列而发生化学修饰 DNA 的表观遗传机制，许多研究表明，在肺癌患者中，基因启动子区的 CpG 岛甲基化是一个较为普遍的现象，对肺癌患者的组织细胞和体液（如痰液、血清及血浆等）进行甲基化基因标志物的检测，是一项有效的肺癌辅助检测方法。

人分泌素基因（Secretin, SCT），其基因表达产物能够阻止细胞再进入周期分裂，抑制细胞浸润、转移和促进细胞凋亡，SCT 基因在肺癌组织中高度甲基化并且可以作为肺癌和其他类型的实体瘤的潜在生物标志物。人同源盒 A7 基因

（Homeobox protein Hox-A7, HOXA7），是 HOX 基因家族中的一员，可以通过基因融合、基因沉默等方式在肿瘤中过高或过低表达，调控肿瘤细胞的发生和发展，HOXA7 基因参与肿瘤的发生，尤其是肿瘤发展的前期和后期阶段，与信号分子（如 MEIS、蛋白激酶-C 等）的相互融合参与调节生物分化与增值，与靶向基因（如 CAVE-OLIN-1 等）相互作用引发基因沉默而失活。人矮小同源盒基因（Short Stature Homobox2, SHOX2），是同源盒基因家族的一员，其基因表达调控与器官发育密切相关，研究发现，SHOX2 基因甲基化与肺癌等肿瘤有关，作为一个常见的转录调控因子，其甲基化水平的高低影响着肿瘤发生的进程。

本试剂盒专有的选择 SCT、HOXA7、SHOX2 基因组合做为肺癌诊断的靶标基因，可用于肺癌疑似人群纤维支气管镜检查过程中的辅助诊断，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，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。

【检验原理】

DNA 的甲基化修饰指 CpG 二核苷酸中胞嘧啶的 5 位碳原子加上一个甲基基团形成 5 甲基胞嘧啶，人基因组 DNA 使用亚硫酸盐处理后，亚硫酸盐可以使非甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶，在 PCR 扩增过程中尿嘧啶再转换为胸腺嘧啶，而甲基化的胞嘧啶保持不变，利用本原理和荧光 PCR 技术针对甲基化的基因序列设计特异性引物和 TaqMan® 探针来区分甲基化和未甲基化的基因。



本试剂盒分别针对人 SCT、HOXA7、SHOX2 基因甲基化序列，设计引物和 TaqMan® 探针来区分甲基化和未甲基化的 SCT、HOXA7 和 SHOX2 基因；另外本试剂盒采用多重多色荧光 PCR 方法，设计不同荧光标记的 TaqMan® 探针在同一反应管中区分 SCT、HOXA7 和 SHOX2 基因，其中 VIC 荧光检测 SCT 基因甲基化 DNA 状态，ROX 荧光检测 HOXA7 基因甲基化 DNA 状态，FAM 荧光检测 SHOX2 基因甲基化 DNA 状态；同时针对内参 ACTB 基因设计了引物和 TaqMan® 探针，利用 CY5 荧光检测内参 ACTB 基因，监控人支气管镜刷检样本的质量及人基因组 DNA 纯化过程。

【主要组成成分】

1. 试剂盒中包含的试剂组分

序号	组分名称	规格	数量	主要成分
1	DNA 聚合酶	15μL/管	1 管	热启动 Taq DNA 聚合酶
2	PCR 反应液	550μL/管	1 管	引物、荧光标记探针、脱氧核糖核苷三磷酸（包括 dATP、dGTP、dTTP 和 dCTP）、氯化镁
3	阳性质控品	20μL/管	1 管	CpG 甲基化人基因组 DNA
4	阴性质控品	15μL/管	1 管	人基因组 DNA

注：1) 不同批号试剂盒的组分不能互换；2) 阳性质控品主要成分是 CpG 甲基化人基因组 DNA，不具有生物活性，因此不会对人体造成危害；2) 各组分均不属于危险化学品、致病性生物活性材料，因此在运输和使用过程中不会对使用者和环境造成危害。

2. 试剂盒中不包含，需自备的试剂、耗材和仪器

2.1 试剂类：广州美基生物科技有限公司的核酸提取或纯化试剂（粤穗械备 20150062 号），货号 IVD3018；德国凯杰（QIAgen）生物公司的核酸提取或纯化试剂 QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit（国械备 20140005），货号为 61104；简石生物技术（浙江）有限公司的甲基化检测样本前处理试剂盒（浙甬械备 20210375 号），货号 JSM530；ZYMO RESEARCH 生物公司 EZ DNA Methylation-Direct™ Kit，货号为 D5020/D5021；生理盐水。

2.2 耗材类：1.5mL 离心管、枪头（规格：10μL、20μL、100μL、200μL、1000μL）、8 联管或 96 孔板、光学 8 联管盖或 96 孔板封口膜。

2.3 仪器类：实时荧光定量 PCR 仪、恒温扩增仪或金属浴、台式离心机、水浴锅、移液器（规格：10μL、100μL、1000μL）。

【储存条件及有效期】

1. 试剂盒于-20±5℃存储，有效期为 6 个月。
2. 试剂盒开封后在-20±5℃可稳定放置；试剂盒反复冻融不超过 5 次。
3. 生产日期及使用期限见试剂盒产品标签。

【适用仪器】

1. 本试剂盒适用于 ABI 7500 、ABI 7500 Fast DX、Roche LightCycler480 实时荧光定量 PCR 仪。
2. 本试剂盒要求仪器使用 VIC、ROX、 FAM 和 CY5 通道采集扩增荧光信号。

【样本要求】

1. 样本类型：支气管镜刷检样本。
2. 样本的采集方法
 - 2.1 人支气管镜刷检样本采集的规范性操作应满足《纤维支气管镜诊断治疗学》（北京大学医学出版社）、《成人诊断性可弯曲支气管镜检查术应用指南（2019 年版）》（中华医学会呼吸病学分会介入呼吸病学学组）和《肺癌小样本取材相关问题的中国专家共识》（中华医学会呼吸病学分会、中国肺癌防治联盟）等临床诊疗指南的要求。
 - 2.2 采用一次性无菌细胞刷进行支气管镜刷检。在直视或 X 线等引导下将刷头送至病变部位，伸出细胞刷，轻柔摩擦病变表面（避免过度用力导致出血），旋转刷头 3-5 圈，获取病变表面细胞，取样结束后将细胞刷退回鞘内，避免污染其他部位，确认无活动性出血后退出支气管镜。将刷检物均匀涂抹于载玻片上，立即固定，用于细胞学检查。随后将刷头剪下，置于 1.5mL 无菌离心管中，可直接用于核酸提取或-20±5℃

保存。

3. 样本前处理方法

3.1 采集到的支气管镜刷检样本可直接进行核酸提取或 $-20\pm5^{\circ}\text{C}$ 保存，也可将洗脱后获得的细胞沉淀进行核酸提取或 $-20\pm5^{\circ}\text{C}$ 保存。若使用细胞沉淀，请将采集的支气管镜刷检样本，用不少于 $200\mu\text{L}$ 生理盐水浸没细胞刷头后，充分震荡混匀， 3000rpm 离心 10min ，去上清，离心管底可见明显沉淀，此沉淀物即为支气管镜刷检获得的细胞，可用于人基因组DNA提取。

3.2 请尽快提取支气管镜刷检样本中的人基因组DNA；如果不能立即提取DNA，请把含细胞的沉淀物或未用生理盐水洗脱的细胞刷直接保存于 $-20\pm5^{\circ}\text{C}$ （保存期限不超过6个月，冻融不超过5次），其他保存条件未验证，请验证后使用。

4. DNA提取

4.1 采用广州美基生物科技有限公司的核酸提取或纯化试剂或德国凯杰（QIAGEN）生物公司的核酸提取或纯化试剂 QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit 对含细胞的沉淀物进行DNA提取，严格按试剂盒说明书操作，最后 $30\mu\text{L}$ 洗脱，所提取的DNA需满足浓度 $\geq 4\text{ng}/\mu\text{L}$ ， $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 在 $1.6\sim 2.0$ 时，才可以用于亚硫酸盐修饰；否则应重新采样。

4.2 请尽快将提取的DNA进行亚硫酸盐修饰；如果不能立即进行亚硫酸盐修饰，请把提取的DNA直接保存于 $-20\pm5^{\circ}\text{C}$ （保存期限不超过6个月，冻融不超过5次）。

5. 亚硫酸盐修饰

5.1 取 $20\mu\text{L}$ 的人基因组DNA（DNA浓度 $4\sim 25\text{ng}/\mu\text{L}$ ，直接取 $20\mu\text{L}$ ；DNA浓度大于 $25\text{ng}/\mu\text{L}$ ，取 500ng DNA，用水稀释至 $20\mu\text{L}$ ），采用简石生物技术（浙江）有限公司的甲基化检测样本前处理试剂盒或 ZYMO RESEARCH 生物公司的 EZ DNA Methylation-Direct™ Kit 进行亚硫酸盐修饰，严格按试剂盒说明书操作，最后 $20\mu\text{L}$ 洗脱。

5.2 取 $5\mu\text{L}$ 的阳性质控品、阴性质控品，分别采用简石生物技术（浙江）有限公司的甲基化检测样本前处理试剂盒或 ZYMO RESEARCH 生物公司的 EZ DNA Methylation-Direct™ Kit 进行亚硫酸盐修饰，严格按试剂盒说明书操作，最后 $20\mu\text{L}$ 洗脱。

5.3 请尽快将亚硫酸盐修饰后的DNA用于荧光PCR检测；如果不能立即检测，请把修饰后的DNA直接保存于 $-20\pm5^{\circ}\text{C}$ （保存期限不超过6个月，冻融不超过5次），其他保存条件未验证，请验证后使用。

【检验方法】

1. 在准备间或配液间将试剂盒打开，将 PCR 反应液和 DNA 聚合酶放入配液间。

2. PCR 混合液的配制

2.1 在配液间，取出 PCR 反应液和 DNA 聚合酶在 2~8℃或室温下进行复融，颠倒混匀，短暂离心后备用。

2.2 根据待检样本数 (n)，再加上各一个反应的阳性质控品和阴性质控品，计算 PCR 混合液的配制总量 (n+2)，具体计算方法见下表。

名称	1 个样本量	n 个样本量
组分-PCR 反应液	21.5×3 μL	21.5× (n+2) μL
组分-DNA 聚合酶	0.5×3 μL	0.5× (n+2) μL
PCR 混合液	22×3μL	22× (n+2) μL

2.3 取离心管（无核糖核酸酶）1 只，按照上表计算好的量依次加入 PCR 反应液和 DNA 聚合酶，颠倒混匀，瞬时离心，按照 22μL/PCR 反应管的量进行分装后备用。

3. PCR 反应的加样

在样本处理间，将亚硫酸盐修饰的阴性质控品、人基因组 DNA、阳性质控品各 3μL 依次加入到分装了 PCR 混合液的 PCR 反应管中，做好标记，扣紧管盖，颠倒混匀（切勿振荡混匀），瞬时离心。

4. PCR 扩增和检测

4.1 在 PCR 扩增间，打开荧光 PCR 仪，依次放入 PCR 反应管。

4.2 按照下表及荧光 PCR 仪的使用说明书，设置 PCR 反应的条件。

PCR 反应条件设置							
循环数	温度	时间		循环数	温度	时间	信号收集
1 Cycle	95℃	10 分钟		50 Cycle	95℃	30 秒	否
					58℃	1 分钟	是

备注：同时收集 FAM (SHOX2)、VIC (SCT)、ROX (HOXA7) 和 CY5 (ACTB) 通道的荧光信号。

4.3 保存扩增文件，运行程序。

4.4 结果获取

4.4.1 扩增曲线特征的描述：扩增曲线一般呈 S 型。

4.4.2 基线设定：根据实验情况，选择荧光本底值较稳定的一段区域作为基线的设定范围或选择自动。

4.4.3 阈值设定：超过阴性质控品扩增曲线的最高点即可。

4.4.4 结果分析：设定好基线和阈值线后，即可进行结果分析。

备注：具体设置方法请参考不同仪器的使用说明书。

【阳性判断值】

采用本试剂盒对 143 例支气管镜刷检样本进行检测，包括临床诊断为肺癌患者样本 72 例，肺炎、结节病、肺结核、支气管扩张等非肺癌患者样本 71 例，通过比较三基因 logic 回归分析、不同临界值组合，最后确定 ACTB 基因的 Ct 值 ≤ 36 时，SCT 基因 Ct 值 ≤ 36 时，判断 SCT 基因甲基化为阳性；HOXA7 基因 Ct 值 ≤ 45 时，判断 HOXA7 基因甲基化为阳性；SHOX2 基因 Ct 值 ≤ 40 时，判断 SHOX2 基因甲基化为阳性。

【检验结果的解释】

1. ACTB 基因 (CY5) 的 Ct 值 > 36 或者无 Ct 值时，判定为样本不合格，建议患者重新取样检测。
2. 本试剂盒包含阳性质控品和阴性质控品。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。阳性质控品的检测应 SCT 基因 Ct 值 ≤ 36 、HOXA7 基因 Ct 值 ≤ 45 、SHOX2 基因 Ct 值 ≤ 40 、ACTB 基因 Ct 值 ≤ 36 ；阴性质控品的检测应 SCT 基因 Ct 值 > 36 或无 Ct 值、HOXA7 基因 Ct 值 > 45 或无 Ct 值、SHOX2 基因 Ct 值 > 40 或无 Ct 值、ACTB 基因 Ct 值 ≤ 36 ，若任一对照结果不符合要求，则此次检测结果无效。建议患者重新取样检测。
3. 本试剂盒能够检测亚硫酸盐转化的内参基因 ACTB，同时能够检测样本是否满足实验要求。ACTB 的 Ct 值有效范围为 Ct ≤ 36 ，如果超出有效范围，说明样本 DNA 含量过低或者 PCR 反应被抑制，则反应无效。建议患者重新取样检测。
4. 在样本检测时，有 3 种可能时判断为阳性：SCT、HOXA7 和 SHOX2 基因均甲基化检测阳性；SCT、HOXA7 和 SHOX2 基因中有两个甲基化检测阳性；SCT、HOXA7 和 SHOX2 基因中有一个甲基化检测阳性。
5. 在样本检测时，当 SCT、HOXA7 和 SHOX2 基因均甲基化检测为阴性，即 SCT 基因检测的 Ct 值 > 36 或无 Ct 值，HOXA7 基因检测的 Ct 值 > 45 或无 Ct 值，SHOX2 基因检测的 Ct 值 > 40 或无 Ct 值，则判断为阴性。

【检验方法的局限性】

1. 本产品仅用于体外诊断，供检测支气管镜刷检样本中人 SCT、HOXA7 和 SHOX2 基因甲基化。
2. 检测结果仅供临床参考，阳性结果不能作为肺癌诊断或确诊的依据，对于患者的

确诊及治疗方案的选择应结合其症状、体征、病理及其他诊断及治疗反应等情况综合考虑。

3. 样本中 DNA 含量过少、核酸过度降解造成的扩增反应体系中靶基因浓度较低，可能造成假阴性结果。

4. 样本的收集、存储以及 DNA 的提取和亚硫酸盐的处理应严格按照【样本要求】的规定处理和保存样本，否则影响检测，造成假阴性和假阳性结果。

5. 由于扩增的初始靶 DNA 含量较低，故扩增循环数较长，应尽量避免检测环境的污染，否则容易在扩增循环末期产生假阳性信号。

【产品性能指标】

1. 外观

1.1 试剂盒外观表面及说明书整洁、无污渍、无破损，标签不褶皱、无脱落。

1.2 试剂盒各组分齐全、无空管，各组分液体澄清，无沉淀、无悬浮物、无絮状物。

1.3 封口贴不褶皱、无脱落，包装盒、说明书和标签文字内容清晰、完整。

2. 准确度

2.1 阳性符合率

试剂盒检测亚硫酸盐修饰后的阳性参考品 SSH-P1~SSH-P12 各一个反应，阳性符合率为 100%。

2.2 阴性符合率

试剂盒检测亚硫酸盐修饰后的阴性参考品 SSH-N1~SSH-N8 各一个反应，阴性符合率为 100%。

2.3 临床样本

使用临床样本进行准确度研究，结果显示检测肺癌的灵敏度 100%，特异性 100%。

3. 批内精密度

试剂盒重复检测亚硫酸盐修饰后的精密度参考品 SSH-J1~SSH-J4 十个反应，分别计算各目标基因 SCT、HOXA7 和 SHOX2 的 Ct 值 CV，CV 均≤5%。

试剂盒对不同浓度和不同甲基化比例的临床样本进行重复性、室内精密度、再现性研究，CV 均≤5%。

4. 检出限

试剂盒重复检测亚硫酸盐修饰后的检测限参考品 SSH-L 的二十个反应，本参考品的目标基因 SCT、HOXA7 和 SHOX2 检出率≥95%。

使用临床样本进行检出限研究，结果表明当样本 DNA 浓度为 4ng/μL 时，试剂盒

可在 95%及以上水平检出 10%的 SCT 甲基化、HOXA7 甲基化、SHOX2 甲基化。

5. 干扰物质

本试剂盒对于如下内源、外源干扰物质及其检测浓度下，均未对检测试剂盒造成干扰。

粘蛋白(2.5%)、血红蛋白(2g/L)、甘油三酯(37mmol/L)、胆红素(342 μ mol/L)、生理盐水鼻喷雾剂(1%)、糠酸莫米松乳膏(5 μ g/mL)、布地奈德鼻喷雾剂(1%)、复方薄荷脑软膏(7.5mg/mL)、磷酸奥司他韦(7.5mg/mL)、阿奇霉素分散片(10mg/mL)、妥布霉素滴眼液(0.6mg/mL)、血清白蛋白(40mg/mL)、胆固醇(5mg/mL)、尿酸(0.235mg/mL)、葡萄糖(10mg/mL)、未甲基化基因组 DNA(100ng/ μ L)、布洛芬(1.07mg/mL)、对乙酰氨基酚(1mg/mL)、头孢(0.27mg/mL)、吉非替尼(0.25mg/mL)、替吉奥(0.95mg/mL)、昂丹司琼(0.24mg/mL)。

6. 交叉反应

本试剂盒对于常见感染性微生物基因组 DNA 无交叉反应，RASSF1A 甲基化 DNA、PTGER4 甲基化 DNA、胃癌、肝癌、乳腺癌、结直肠癌等无交叉反应，肺结核、肺炎、肺部感染、肺结节、肺纤维病变等常见的肺癌影像鉴别诊断类疾病的综合特异度大于 90%。

7. 临床验证

申请人在三家临床机构进行临床试验。采用试验体外诊断试剂与临床参考标准和实验室参考方法进行比较研究，确认本产品的临床性能。样本类型为支气管镜刷检样本。针对与临床参考标准的比较，试验结果显示，本产品针对肺癌的临床灵敏度为 87.8%，临床特异度为 95.02%。此外，采用试验体外诊断试剂与实验室参考方法（Sanger 测序）进行比较研究，确认本产品的临床检测性能。试验结果显示：针对 SCT 基因，阳性符合率为 100%，阴性符合率为 100%；针对 HOXA7 基因，阳性符合率为 100%，阴性符合率为 99.2%；针对 SHOX2 基因，阳性符合率为 98.85%，阴性符合率为 100%。

【注意事项】

- ◆ 本试剂盒必须由经过 PCR 实验相关培训的人员进行使用。
- ◆ 试剂开封后应在开封效期内尽快使用。
- ◆ 每次实验前应对仪器及配套电源系统进行初步检查并定期进行设备维护和保养，以保证仪器正常运行和实验结果稳定。实时荧光 PCR 仪需经常校正和清洁载样板板孔。

- ◆ 为避免试剂吸取过程中意外喷溅等造成的实验区污染,建议使用前混匀并短暂低速离心。
- ◆ 产品使用过程应使用经过校准的移液器。选用合格的一次性使用的 PCR 反应管、离心管、枪头等进行样本处理及配液等操作,所有用具应不含 DNA 酶和 RNA 酶。
- ◆ 为避免实验过程意外引入污染,保证 PCR 实验结果准确性,建议用户依据《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》并结合自身实际情况建立核酸扩增实验室体系,在实验过程中要严格按照相关规范进行操作。
- ◆ 待测样本尽可能新鲜,提取过程应严防 RNA 酶和 DNA 酶污染及操作不当导致的 RNA 和 DNA 降解。冷冻保存的样本,加样前应在室温充分融化、混匀并瞬时低速离心后使用。
- ◆ 加样时应使样品完全加入反应液中,不应有样品粘附于管壁上,加样后应尽快盖紧管盖。
- ◆ 反应液分装时尽量避免产生气泡,上机前注意检查各反应管是否盖紧,避免泄露污染仪器。
- ◆ 检测过程中使用过的 PCR 反应管、离心管、枪头等应及时密封在专用塑料袋内,丢弃于指定地点,并按照实验室相关规范进行处理以防止污染。
- ◆ 样本应按传染性物质对待,操作过程中应注意样本管漏液及手套破损,如遇样本管漏液或手套破损,按实验室相关规范进行处理。
- ◆ 为防止荧光干扰,避免用手直接接触 8 联管管盖,勿在管盖上标记。
- ◆ 使用过程应注意产品批号及有效期,避免使用过期产品及避免不同批号试剂组分混用。

【参考文献】

- [1] 中华医学会肿瘤学分会,中华医学会杂志社.中华医学会肺癌临床诊疗指南(2023版)[J].中华医学杂志,2023,103(27):2037-2074.
- [2] 中国肺癌早诊早治专家组,中国西部肺癌研究协作中心.中国肺癌低剂量 CT 筛查指南(2023年版).中国肺癌杂志,2023,26(1):1-9.
- [3] 中华医学会呼吸病学分会、中国肺癌防治联盟专家组.肺结节诊治中国专家共识(2024年版)[J].中华结核和呼吸杂志,2024,47(8):717-729.
- [4] 中华医学会呼吸病学分会介入呼吸病学学组.成人诊断性可弯曲支气管镜检查术应用指南(2019年版)[J].中华结核和呼吸杂志,2019,42(8):573-590.
- [5] 中华医学会呼吸病学分会、中国肺癌防治联盟.肺癌小样本取材相关问题的中国专家共识[J].中华内科杂志,2016,55(5):406-413.

[6] 赖伊杰等. 肿瘤细胞 DNA 甲基化检测技术与研究方法新进展[J]. 生命科学, 2016, 28 (4): 513-520.

[7] Heichman KA, Warren JD. DNA methylation biomarkers and their utility for solid cancer diagnostics[J]. Clin Chem Lab Med, 2012, 50(10): 1707-1721.

[8] Sathe A, Zhang Y-A, Ma X, et al. SCT promotor methylation is a highly discriminative biomarker for lung and many others cancers. IEEE Life Sciences Letter. 2015, 1:30-33.

[9] Rauch T, Wang Z-D, Zhang X-M. et al. Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay.

[10] B. Schmidt et al. SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer based on bronchial aspirates BMC Cancer, 2010, 10:600.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 苏州呼呼健康科技有限公司

注册人/生产企业住所: 苏州工业园区星湖街 218 号 B2-305 单元

联系方式:

售后服务单位名称:

联系方式:

生产地址: 苏州工业园区星湖街 218 号 B2-305、307、A2-330 单元

生产许可证编号:

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书批准日期/生效日期及修改日期】