

# 尿液 PAX2 基因甲基化检测试剂盒

## (PCR 荧光探针法) 说明书

### 产品包装

规格: 32 反应/盒

目录号: PS04-32

| 组 分     | 主要组成成分    | 体 积           | 数 量 | 管盖颜色 |
|---------|-----------|---------------|-----|------|
| PCR 反应液 | 引物探针、dNTP | 400 $\mu$ L/管 | 1 管 | 绿色   |
| 酶液      | Taq 热启动酶  | 20 $\mu$ L/管  | 1 管 | 白色   |

### 储存条件及有效期

- 试剂盒应置于 $\leq -15^{\circ}\text{C}$ 条件下避光保存, 有效期为 12 个月。
- 试剂盒开盖后可在  $2\sim 8^{\circ}\text{C}$  避光保存不超过 1 周。
- 试剂盒在使用时应尽量避免反复冻融, 冻融次数不可超过 5 次。
- 试剂盒可采用泡沫盒加干冰或冰袋密封低温运输。

### 产品介绍

本试剂盒用于检测尿液中 PAX2 基因的甲基化情况, 提供液体活检肿瘤基因甲基化测试的一种实验室培训方案。

#### 检验原理

PAX2 基因在人的肾脏组织中发生甲基化, 但罕见在其他组织中发生甲基化[1]; 而肾脏细胞脱落后会进入尿液, 因此通过检测尿液中 PAX2 基因的甲基化, 可以提供液体活检肿瘤基因甲基化测试的一种实验室培训方案。

本试剂盒采用实时荧光定量 PCR 的 Taqman 探针法。使用指定的尿液处理试剂盒提取, 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磺酸盐, 发生甲基化的胞嘧啶则不会被亚硫酸盐转化。

针对转化后的甲基化基因 PAX2 和内参对照基因 ACTB 分别设计特异性引物和探针, 在一个反应管中进行双通道检测, 其中甲基化 PAX2 基因的探针报告基因为 FAM, ACTB 基因的探针报告基因为 HEX。在 PCR 过程中, 引物及探针首先特异性结合到靶序列上时, 然后在 PCR 延伸过程中, Taq 酶以其 5' 端外切酶活性将结合在靶序列上的探针报告基团酶解下来, 游离的 5' 标记报告基团荧光信号可被检测到。通过每个 PCR 循环检测到的荧光信号强度, 建立实时扩增曲线, 从而确定 Ct 值。PCR 反应结束后, 每一个样本会得到两个 Ct 值, HEX 通道的 ACTB Ct 值用于评估亚硫酸盐转化样本的 DNA 含量和质量, 而 FAM 通道的 PAX2 Ct 值, 则可判定样本是否含有甲基化的 PAX2 基因核酸片段。

## 样本要求

- 本试剂盒适用样本类型为人尿液亚硫酸盐转化 DNA (bisDNA)。
- **样本采集:** 使用广州赛库生物技术有限公司的尿液 DNA 样本保存瓶(目录号: PS01-01), 采集量不少于 20mL。
- **样本处理:** 本试剂盒未配有尿液样本的处理试剂, 推荐分别使用广州赛库生物技术有限公司的液体游离 DNA 提取试剂盒(磁珠法)(目录号: PS02)进行核酸提取, 亚硫酸盐转化和回收试剂盒(磁珠法)(目录号: PS03)进行亚硫酸盐转化。
- **样本保存:** 尿液标本采集后, 应尽量于当日进行 DNA 提取, 如需保存, 室温保存不应超过 48h, 2~8℃保存不应超过 1 周, ≤-15℃保存不应超过 1 个月, 避免反复冻融。转化后的 bisDNA 样本建议尽快进行检测, 如需保存, 在 2~8℃保存不应超过 24 小时, ≤-15℃保存不应超过 72 小时, 避免反复冻融。
- **样本运输:** 4℃运输尿液。

## 适用仪器

实时荧光定量 PCR 仪。

## 操作说明

### 1. 样本处理

取尿液样本, 按提取试剂盒说明书要求进行 DNA 的提取和亚硫酸盐转化。

### 2. PCR 反应液准备 (在试剂准备区进行)

- 1) 从试剂盒中取出 PCR 反应液, 室温避光放置, 充分解冻后瞬时离心, 涡旋混匀, 再次瞬时离心使液体聚集管底;
- 2) 按每反应需要 11.5 μL PCR 反应液和 0.5 μL 酶液, 根据所需检测的反应数取相应体积的 PCR 反应液和酶液加入到离心管中, 涡旋混匀, 瞬时离心, 得到 PCR 预反应液;
- 3) 按 12 μL/反应分装 PCR 预反应液至 PCR 反应孔中;
- 4) 剩余试剂应立即放回冰箱避光保存。

### 3. 加样 (在样品制备区进行)

- 1) 在分装好的 PCR 反应孔中分别加入 8 μL 待测样本 bisDNA, 反应总体积 20 μL;
- 2) 盖好 PCR 反应管盖, 瞬时离心使所有液体集中到反应管底部, 移至扩增区上机检测。

### 4. PCR 扩增 (在扩增区进行)

将 PCR 反应管放入荧光定量 PCR 仪器中, 使用 SLAN-96P 时, 选择模块控温, PAX2 选取 FAM 通道, ACTB 选取 HEX 通道; 使用 ABI7500 时, 无需选择控温方式, 探针模式设置为 PAX2 Reporter Dye: FAM, Quencher Dye: NFQ-MGB; ACTB Reporter Dye: VIC, Quencher Dye: None, Passive Reference: None。

按下表设置反应条件进行 PCR 扩增:

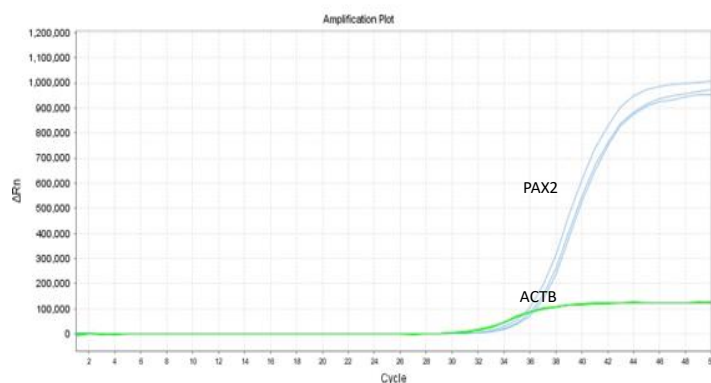
| 步骤 | 温度    | 时间           | 升降温速率 | 循环数 |
|----|-------|--------------|-------|-----|
| 1  | 50 °C | 5min         | 100%  | 1   |
| 2  | 94°C  | 20min        | 40%   | 1   |
| 3  | 56 °C | 1min         | 80%   | 50  |
|    | 65°C  | 30sec (采集荧光) | 80%   |     |
|    | 93 °C | 30sec        | 40%   |     |

## 5. 结果获取

- 1) 扩增曲线特征的描述: 扩增曲线一般呈 S 型;
- 2) 基线设定: 可选择自动基线, 也可手动调节基线。手动基线的起点可选择 3~5 之间, 一般情况选择 5; 基线终点可选择 15~20 之间, 一般情况选择 18, 若存在高浓度样本起峰早于 15, 则根据最高浓度样本情况设定;
- 3) 阈值设定: 以高于所有噪音线且略高于正常空白对照扩增曲线(无规则的噪音线)的最高点作为阈值, 即空白对照 “NoCt” 或 “Undetermined” 为准;
- 4) 结果分析: 设定好基线和阈值后, 即可进行结果分析获取 Ct 值。选择 FAM 通道即为 PAX2 的检测结果, HEX/VIC 通道即为 ACTB 的检测结果。

## 6. 结果

内部对照: 内部对照 ACTB 用以监控检测样品的质量, 正常人尿液中的 ACTB 的 Ct 值绝大部分分布在 26~33 之间, PAX2 的 Ct 值绝大部分分布在 29~36 之间。qPCR 反应代表图如下, 绿色曲线是 ACTB, 蓝色曲线是 PAX2 的反应曲线。



## 参考文献

- [1] Liu XM, et al., Comprehensive DNA methylation analysis of tissue of origin of plasma cell-free DNA by methylated CpG tandem amplification and sequencing (MCTA-Seq). Clinical Epigenetics, 2019,11:93.

## 注意事项

- 本试剂盒仅供科研使用。
- 实验前请仔细阅读本说明书, 并严格按照说明书要求进行操作。



(官网)



(公众号)