

人 Kras 基因 c.34G>T(p.G12C)点突变探针法

qPCR 检测试剂盒

目录号: [ml107891](#)

使 用 说 明 书

产品及特点

KRAS 基因的全名叫 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog, (Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物), 它编码一种小 GTP 酶, 该酶属于 RAS 超蛋白家族。KRAS 基因位于 1 号染色体上。大约有 30% 的癌症患者都存在 KRAS 突变, 其中包括 90% 的胰腺癌, 50% 的结肠癌和 25% 的肺癌。在非小细胞肺癌中, KRAS 基因突变占 20 ~ 30%, 多存在于肺腺癌中, 肺鳞癌中比较罕见。在 KRAS 突变类型中, c.34G>T(p.G12C)突变最常见, 约占所有 KRAS 突变的 44%, 最常见的癌种是非小细胞肺癌, 因此快速检测此突变具有重要的意义。为此本公司开发了简单快捷的检测该位点的点突变探针法 qPCR 检测试剂盒, **它具有下列特点:**

1. 即开即用, 用户只需要提供样品 DNA 模板。
2. 引物和探针经过优化, 分析灵敏性高, 可以达到 1000 拷贝/ μ L。
3. 能检测出 5% 的点突变。

4. 提供两种阳性对照，便于区分假阴性样品。
5. 特异性高，引物是根据人 Kras 基因 rs121913530 位点设计，不会跟其他位点的 DNA 发生交叉反应。
6. 本产品只能定性，不能定量。
7. 本产品足够 50 次 20 μ L 体系的点突变探针法荧光定量 PCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

成分	规格	包装
2 $\times$ 点突变 Probe qPCR MagicMix	0.5mL	0.5mL 本色管
超纯水	1mL	1.5mL 蓝盖管
rs121913530 位点检测 引物-探针混合液干粉	50 次	0.5mL 白色管
rs121913530 位点 GG 阳性对照(1 $\times$ 10E4 拷贝/ μ L)	250 μ L	1.5 mL 棕色管
rs121913530 位点 TT 阳性对照(1 $\times$ 10E4 拷贝/ μ L)	250 μ L	0.5 mL 黄盖管
使用手册	1 份	无
本产品采用五孔盒包装		

使用方法

二、样品 DNA 的制备

1. 如果有 N 个样品，则进行 N 次纯化，得到的 DNA 最后溶解在 TE 中，并需要用 NanoDrop 进行定量。最后的浓度不能低于 0.2ug/ μ L。
2. 本试剂盒跟市场上大多数样品 DNA 提取试剂盒兼容。

三、点突变 Probe qPCR 反应 (20 μ L 体系，在样品制备室进行)

3. 如果只做 1 次重复，则标记 N+3 个 PCR 管，其中 N 个用于上步得到的 N 样品，1 个用于 PCR 阴性对照（用水做模板，NC），3 个用于阳性对照（分别对应两种纯合子基因型和一种杂合子基因

型)。

4. 在标记管中按下表加入各成分 (本表只列出一次重复。样品管和阴性对照设置完毕后才设置阳性对照, 并且阳性对照样品要等所有管子盖上盖子储存好后加) :

成分	样品管 N 个	NC	GG	GT	TT
2×点突变 Probe qPCR MagicMix	各 10μL	10μL	10μL	10μL	10μL
rs121913530 位点检测引物-探针混合液	各 4μL	4μL	4μL	4μL	4μL
N 个 DNA 样本	各 3μL				
超纯水	各 3μL	6μL	3μL		3μL
rs121913530 位点 GG 阳性对照(1×10E4 拷贝/μL)			3μL	3μL	不加
rs121913530 位点 TT 阳性对照(1×10E4 拷贝/μL)				3μL	3μL

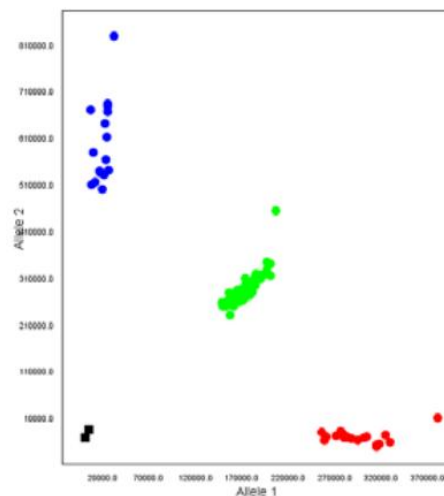
5. 盖上盖子后上机, 按下面参数进行 PCR:

过程	温度	时间
预变性	95°C	90sec
PCR 反应 (45 个循环)	95°C	15sec
	60°C	60 sec (采集 FAM 和 HEX 通道的荧光信号, 淬灭基团均为 TAMRA)

五、数据处理

6. 一般的荧光定量 PCR 仪在基因分型的模式下, 都可以自动根据两个通道获得的荧光值, 计算每个样品的比值 (HEX 值/FAM 值), 并描出散点图。突变基因型的比值点将位于散点图的 X 轴方向, 正常基因型的比值将位于 Y 轴方向, 杂合子基因型的比值将位于中间, 阴性对照的比值将位于原点

附近。如果阴性对照有任何信号，则表示污染，本次实验无效，需要寻找原因。散点图的示例如下：



7. 也可以手动整理下表进行基因型判断。首先设置阈值，FAM 的阈值根据 GG 阳性对照的 FAM 荧光值设置，HEX 的阈值根据 TT 阳性对照的 HEX 荧光值设置。如果阴性对照有任何信号，则表示污染，本次实验无效，需要寻找原因。如果实验有效，则分析样品。如果样品 Ct 值低于 35，则算有扩增。高于 35，则算无扩增。

阳性对照	FAM 通道	HEX 通道	基因型
GG 阳性对照	无扩增	有扩增	纯合突变
GT 阳性对照	有扩增	有扩增	杂合突变
TT 阳性对照	有扩增	无扩增	正常
阴性对照	无扩增	无扩增	-

自备试剂

样品 DNA。

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期 1 年。

