



**人 Kras 基因 c.34G>T(p.G12C)点突变探针法
qPCR 检测试剂盒**

货号: JLC_Y7387

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/μL。
- 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 20μL 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×点突变 Probe qPCR MagicMix	0.5mL	0.5 mL 本色管
超纯水	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
rs121913530 位点检测引物-探针混合液干粉	50 次	0.5 mL 白色管
rs121913530 位点 GG 阳性对照(1×10E4 拷贝/μL)	250 μL	1.5 mL 棕色管
rs121913530 位点 TT 阳性对照(1×10E4 拷贝/μL)	250 μL	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

一、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/μL。
2. 本试剂盒跟市场上大多数样品 DNA 提取试剂盒兼容。

二、点突变 Probe qPCR 反应 (20μL 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 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
rs121913530 位点检测引物-探针混合液	各 4 μL	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL
N 个 DNA 样本	各 3 μL				
超纯水	各 3 μL	6 μL	3 μL		3 μL
rs121913530 位点 GG 阳性对照(1×10E4 拷贝/μL)			3 μL	3 μL	不加
rs121913530 位点 TT 阳性对照(1×10E4 拷贝/μL)				3 μL	3 μL

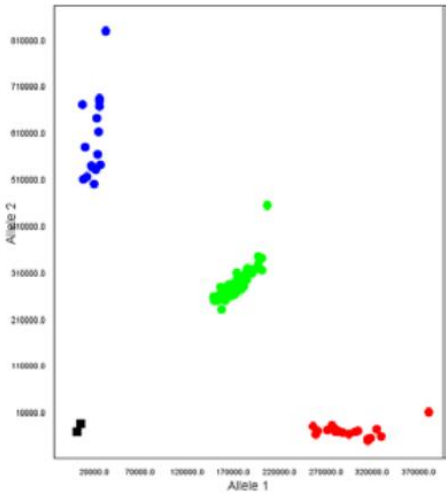
5. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR：

过程	温度	时间
预变性	95℃	90sec.
PCR 反应	95℃	15sec.

(45 个循环)	60°C	60 sec (采集 FAM 和 HEX 通道的荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA)
----------	------	--

三、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。

生产企业：上海机纯实业有限公司

公司地址：上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603

公司电话：021-54720761

技术支持：13166274223