天净沙系列

CAT#:15-001kras-9

低温运输，-20℃保存

天净沙

人 Kras 基因 38G>A（G13D）位点多态性探针法 qPCR 检测试剂盒

Human Kras Gene 38G>A（G13D）Point Mutation Probe qPCR Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

人 KRAS 基因位于 12 号染色体，由编码序列（外显子）和非编码序列（内含子）等部分组成，其编码的 KRAS 蛋白是一种长度为 189 个氨基酸的小 GTP 酶，通过 GTP/GDP 的循环状态调控细胞生长与增殖。该基因的点突变，特别是发生在第 12 或 13 位密码子的突变，会损害 KRAS 自身的水解 GTP 能力，导致蛋白持续活化，进而驱动肿瘤发生。其中，38G>A（G13D）是一个重要的致病性突变，它是指第 38 位核苷酸 G>A 的替换，致使蛋白第 13 位的甘氨酸被天冬氨酸取代。此突变并非良性多态性，而是常见于结直肠癌、胰腺癌等恶性肿瘤中的驱动突变，其核心临床意义在于能预测患者对西妥昔单抗等抗 EGFR 靶向药物的耐药性，是指导肿瘤精准治疗的关键生物标志物。因此研究人 Kras 基因 38G>A（G13D）位点多态性具有重要意义，为此本公司开发了专门检测人 Kras 基因 38G>A（G13D）位点多态性的探针法 PCR 检测试剂盒，它有下列特点：

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. 分辨率高，能检测出 5%的点突变。
4. 一管式检测，野生型探针用 FAM 标记，突变型探针用 Cy5 标记。
5. 同时提供野生型和突变型两种阳性对照，便于排除假阴性样品。
6. 特异性高，引物和探针是根据人 Kras 基因 38G>A（G13D）位点设计，不会跟其他突变发生交叉反应。
7. 本产品只能定性，不能定量。
8. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的点突变探针法荧光定量 PCR 反应。
9. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×点突变 Probe qPCR MasterMix	190303	0.5 mL	0.5 mL 本色管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
人 Kras 基因 38GA 位点检测引物-探针混合液干粉	yp15-001kras-9	50 次	0.5 mL 白盖管
人 Kras 基因 2 号外显子 野生型阳性对照（1E4 拷贝/μL）	pc001kras-ex2	250 μL	1.5 mL 棕色管
人 Kras 基因 38GA 位点 突变型阳性对照（1E4 拷贝/μL）	pc15-001kras-9	250 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	sc15-001kras-9	1 份	无

注意：使用前需要在引物探针干粉管中加入 220 μL 的自备超纯水，震荡混匀后再取用

	一次没用完剩下的需要放-20℃保存。
运输及保存	低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。
自备试剂	样品 DNA。
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 0.2 μg/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（20 μL 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（PC）。 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后最后加）：

成分	样品管 N 个	扩增 NC	野生型 PC	杂合型 PC	突变型 PC
2×点突变 Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
人 Kras 基因 38GA 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
人 Kras 基因 2 号外显子野生型阳性对照（1E4 拷贝/μL）			3 μL	3 μL	
人 Kras 基因 38GA 位点突变型阳性对照（1E4 拷贝/μL）				3 μL	3 μL

5. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR:

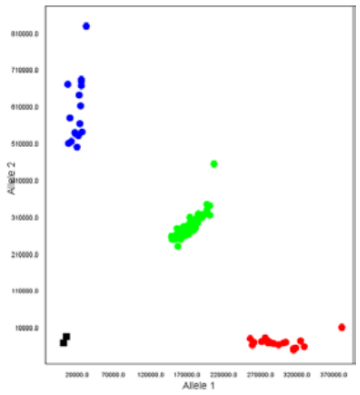
过程	温度	时间
预变性	95℃	90 sec
PCR 反应 （45 个循环）	95℃	15 sec
	60℃	60 sec（采集 FAM 和 Cy5 通道的荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA）

三、数据处理

6. 实验有效性的判断：首先分析扩增 NC 是否有 FAM 或/和 Cy5 信号，如果有则表示实验污染，本次实验无效，无需分析所有实验数据，需要寻找原因。如果无则表示实验没有污染，再分析三个 PC。如果野生型 PC 没有 FAM 扩增信号（有标准的倒 S 扩增曲线，下同），或突变型 PC 没有 Cy5 扩增信号，或杂合型 PC 没有 FAM

和 Cy5 扩增信号，则表示实验无效，不需要分析样本的数据，需要分析原因。如果三个 PC 正常（野生型 PC 有 FAM 扩增信号，突变型 PC 有 Cy5 扩增信号，杂合型 PC 有 FAM 和 Cy5 扩增信号），则实验有效，可以分析样本的数据。

7. 如果荧光定量 PCR 仪有基因分型的自动分析模块，则进入该模块，获得每个样本的 Cy5 值/FAM 值的荧光比值，并根据荧光比值描出散点图。荧光比值位于散点图的 X 轴方向的样本可以判为突变型，荧光比值将位于 Y 轴方向的样本可以判为野生型，荧光比值位于 X 轴和 Y 轴中间的可以判为杂合子。扩增 NC 的荧光比值将位于原点附近。散点图的示例如下：



8. 如果荧光定量 PCR 仪没有基因分型的自动分析模块，则需要手动分析。首先根据 Ct 值判断每个样本在 FAM 和 Cy5 两个通道的扩增情况。如果 FAM 通道的 Ct 低于 45，则算 FAM 信号有扩增。如果 Ct 大于 45 或没有 Ct，则算 FAM 通道无扩增。Cy5 通道也如此操作。然后根据扩增结果按下表判断每个样本的基因型，得到无效数据的样本需要重复：

FAM 通道	Cy5 通道	基因型判断
有扩增	无扩增	野生型
有扩增	有扩增	杂合子
无扩增	有扩增	突变型
无扩增	无扩增	阴性 PC 或无效数据

关联产品	人 5HTR1A 基因 1019C>G 位点多态性探针法 PCR 检测试剂盒