天净沙系列

CAT#:15-001abcb1-2

低温运输，-20℃保存

天净沙

# 人 ABCB1 基因 C3435T（I1145I）位点多态性探针法 qPCR 检测试剂盒

## 使用手册 V1.0

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（Human）ABCB1 基因编码 1280 个氨基酸，该基因的突变是导致多重耐药(MDR)的主要原因，其中 3435C>T（I1145I）位点突变最为常见。因此对该位点进行分型具有重要意义，为此本公司开发了本分型试剂盒，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/反应。
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 HEX 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 ABCB1 基因 3435C>T 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 |
|---|---|---|---|
| 探针法 SNP 分型 PCR MasterMix | 981201-2 | 0.5 mL | 0.5 mL 本色管 |
| 超纯水 | 210806 | 1 mL | 1.5 mL 蓝盖管 |
| 人 ABCB1 3435CT 分型引物-探针干粉 | yp15-001abcb1-2 | 50 次 | 0.5 mL 棕色管 |
| 人 ABCB1 3435C 阳性对照 (1E4 拷贝/μL) | pc001abcb1-2-OK33 | 250 μL | 0.5 mL 白盖管 |
| 人 ABCB1 3435T 阳性对照 (1E4 拷贝/μL) | pc001abcb1-2-OK32 | 250 μL | 0.5 mL 黄盖管 |
| 使用手册 | sc15-001abcb1-2 | 1 份 | 无 |

## 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. 首次使用本试剂盒前，需要在引物-探针干粉管中加入 220 μL 的超纯水，震荡混匀

后得引物-探针混合液，放冰上待用。一次实验没用完剩下的需要放-20℃保存。

4. 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 个用于扩增阴性对照（ANC，用水做模板），3 个用于扩增阳性对照（APC）。

5. 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 ANC 设置完毕后才设置 APC，并且阳性对照样品要等所有管子盖上盖子后最后加）：

| 成分 | N 个<br>样品管 | ANC 管 | 野生型<br>APC 管 | 杂合型<br>APC | 突变型<br>APC |
|---|---|---|---|---|---|
| 探针法 SNP 分型 PCR MasterMix | 各 10 μL | 10 μL | 10 μL | 10 μL | 10 μL |
| 人 ABCB1 3435CT 分型引物-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 ABCB1 3435C 阳性对照 (1E4 拷贝/μL) | | | 3 μL | 3 μL | |
| 人 ABCB1 3435T 阳性对照 (1E4 拷贝/μL) | | | | 3 μL | 3 μL |

6. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR:

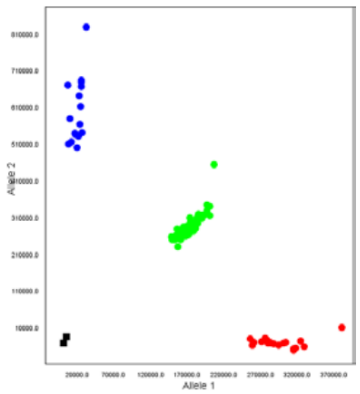
| 过程 | 温度 | 时间 |
|---|---|---|
| 预变性 | 95℃ | 5 min |
| PCR 反应<br>(35 个循环) | 95℃ | 15 sec |
| | 65.2℃ | 30 sec. |
| | 72℃ | 30 sec（采集 FAM 和 HEX 通道的荧光信号，淬灭基团均为 BHQ） |

**三、数据处理**

7. 实验有效性的判断：首先分析 ANC 是否有 FAM 或/和 HEX 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 APC。如果野生型 APC 没有 FAM 扩增信号（有标准的倒 S 扩增曲线，下同），或突变型 APC 没有 HEX 扩增信号，或杂合型 APC 没有 FAM 和 HEX 扩增信号，则本次实验无效，不需要分析样本的数据，需要分析失败原因。如果三个 APC 正常（野生型 APC 有 FAM 扩增信号，突变型 APC 有 HEX 扩增信号，杂合型 APC 有 FAM 和 HEX 扩增信号），则实验有效，可以分析样本的数据。

8. 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 HEX 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。ANC 的 HEX 值/FAM 值荧光比值将位于原点附近。散点图的示例如下：



9. 如果荧光定量 PCR 仪没有基因分型自动分析模块，则需要手动分析。首先根据 Ct 值判断每个样本在 FAM 和 HEX 两个通道的扩增情况。如果 FAM 通道的 Ct 低于 29，则算 FAM 信号有扩增。如果 Ct 大于 29 或没有 Ct，则算 FAM 通道无扩增。HEX 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 | HEX 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 ALDH2 基因 1510G>A(E504K)位点多态性探针法 PCR 检测试剂盒 |