

人EGFR基因L858R(c.2573T>G)点突变探针法qPCR检测试剂盒(不含内参)

货号: BN65406

低温运输, -20℃保存

产品及特点

EGFR基因的全名叫表皮生长因子受体(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR), 是一种广泛分布于人体各组织细胞膜上的具有酪氨酸激酶的糖蛋白, 在许多实体肿瘤中EGFR高表达或异常表达, 因此, 以EGFR为治疗靶标的分子靶向治疗成为国内外肿瘤界关注的焦点。EGFR基因位于1号染色体上。大约有30%的癌症患者都存在EGFR突变, 其中包括90%的胰腺癌, 50%的结肠癌和25%的肺癌。携带21外显子氨基酸替换突变L858R的NSCLC患者对酪氨酸激酶抑制剂高度敏感。这种突变是EGFR突变中比较常见的一种, 占EGFR突变总数的40%-50%。L858R突变的肺癌患者的预后仍然受到多种因素的影响。一般来说, 早期诊断、早期治疗可以提高患者的生存率, 因此研究此突变具有重要的研究意义。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EGFR基因rs121434568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。

本产品仅用于科研

规格及成分

本产品采用5孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×点突变Probe qPCR MasterMix	60001	0.5 mL	0.5 mL
超纯水	60002	1 mL	1.5 mL
rs121434568位点检测 引物-探针混合液干粉	65406-3	50次	0.5 mL
rs121434568位点TT 阳性对照(1×10E4拷贝/μL)	65406-4	250 μL	1.5 mL
rs121434568位点GG 阳性对照(1×10E4拷贝/μL)	65406-5	250 μL	0.5 mL
使用手册	65406-6	1份	无

注意：使用前需要在引物探针干粉管中加入160 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0.2ug/μL。
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（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最后加）：

成分	样品管 N个	NC	TT	TG	GG
2×点突变Probe qPCR MasterMix	各10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
rs121434568位点检测 引物-探针混合液	各4 μL	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL

本产品仅用于科研

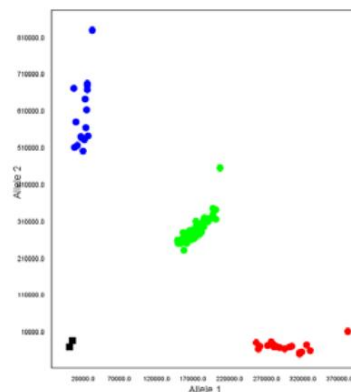
N个DNA样本	各3 μ L				
超纯水	各3 μ L	6 μ L	3 μ L		3 μ L
rs121434568位点TT 阳性对照(1×10^4 拷贝/ μ L)			3 μ L	3 μ L	
rs121434568位点GG 阳性对照(1×10^4 拷贝/ μ L)				3 μ L	3 μ L

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 $^{\circ}$ C	90 sec
PCR反应 (45个循环)	95 $^{\circ}$ C	15 sec
	60 $^{\circ}$ 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：



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
TT阳性对照	无扩增	有扩增	正常
TG阳性对照	有扩增	有扩增	杂合突变
GG阳性对照	有扩增	无扩增	纯合突变
阴性对照	无扩增	无扩增	-