

人BRAF基因c.1799T>A(V600E)点突变探针法qPCR检测试剂盒

货号: BN65356

低温运输, -20℃保存

产品及特点

BRAF基因位于人7号染色体上, 该基因编码RAF家族丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。该基因编码的蛋白在调节MAPK/ERK信号通路中起作用, 影响细胞分裂, 分化和分泌。BRAF基因最常见的突变为1799T>A (V600E), 常在黑色素瘤, 非霍奇金淋巴瘤, 大肠癌等肿瘤疾病中发生突变。人BRAF基因的15号外显子1799T>A (V600E) 点突变与多种肿瘤疾病有关, 因此研究1799T>A突变具有重要的研究意义, 为此本公司开发了专门检测1799T>A突变的探针法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. 分辨率高, 能检测出5%的点突变。
4. 一管式检测, 突变型探针用FAM标记, 野生型探针用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BRAF基因1799T>A突变设计, 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 μ L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×SNP Probe qPCR MasterMix	60001	0.5 mL	0.5 mL
超纯水	60002	1 mL	1.5 mL
人BRAF基因rs113488022位点 检测引物-探针干粉	65356-1	50次	0.5 mL
人BRAF基因15号外显子野生型 阳性对照(1×10 ⁴ 拷贝/ μ L)	65356-2	250 μ L	0.5 mL
人BRAF基因rs113488022位点 突变型阳性对照(1×10 ⁴ 拷贝/ μ L)	65356-3	250 μ L	0.5 mL

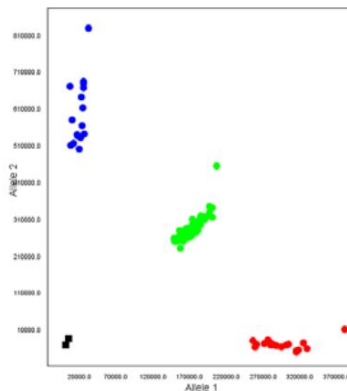
本产品仅用于科研

	使用手册	65356-6	1份	无																																																					
注意：使用前需要将引物探针干粉管短暂离心后加入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24个月。																																																								
自备物品	样品DNA。																																																								
使用方法	<p>一、样品DNA的制备</p> <ol style="list-style-type: none"> 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0.2μg/μL。 本试剂盒跟市场上大多数样品DNA提取试剂盒兼容。 <p>三、点突变Probe qPCR反应（20μL体系，在样品制备室进行）</p> <ol style="list-style-type: none"> 如果只做1次重复，则标记N+4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）。 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）： <table border="1" data-bbox="399 1108 1426 1680"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>样品管 N个</th> <th>扩增 NC</th> <th>野生型 PC</th> <th>杂合型 PC</th> <th>突变型 PC</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2×SNP Probe qPCR MasterMix</td> <td>各10 μL</td> <td>10 μL</td> <td>10 μL</td> <td>10 μL</td> <td>10 μL</td> </tr> <tr> <td>rs113488022位点检测引物-探针混合液</td> <td>各4 μL</td> <td>4 μL</td> <td>4 μL</td> <td>4 μL</td> <td>4 μL</td> </tr> <tr> <td>N个DNA样本</td> <td>各3 μL</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>各3 μL</td> <td>6 μL</td> <td>3 μL</td> <td></td> <td>3 μL</td> </tr> <tr> <td>人BRAF基因15号外显子野生型阳性对照(1×10E4拷贝/μL)</td> <td></td> <td></td> <td>3 μL</td> <td>3 μL</td> <td></td> </tr> <tr> <td>人BRAF基因rs113488022位点突变型阳性对照(1×10E4拷贝/μL)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>3 μL</td> <td>3 μL</td> </tr> </tbody> </table> <ol style="list-style-type: none"> 盖上盖子后上机，按下面参数进行PCR： <table border="1" data-bbox="438 1736 1388 2002"> <thead> <tr> <th>过程</th> <th>温度</th> <th>时间</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>预变性</td> <td>95℃</td> <td>5 min</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">PCR反应 (40个循环)</td> <td>95℃</td> <td>15 sec</td> </tr> <tr> <td>60℃</td> <td>30 sec</td> </tr> </tbody> </table>				成分	样品管 N个	扩增 NC	野生型 PC	杂合型 PC	突变型 PC	2×SNP Probe qPCR MasterMix	各10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	rs113488022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BRAF基因15号外显子野生型阳性对照(1×10E4拷贝/μL)			3 μL	3 μL		人BRAF基因rs113488022位点突变型阳性对照(1×10E4拷贝/μL)				3 μL	3 μL	过程	温度	时间	预变性	95℃	5 min	PCR反应 (40个循环)	95℃	15 sec	60℃	30 sec
成分	样品管 N个	扩增 NC	野生型 PC	杂合型 PC	突变型 PC																																																				
2×SNP Probe qPCR MasterMix	各10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL																																																				
rs113488022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BRAF基因15号外显子野生型阳性对照(1×10E4拷贝/μL)			3 μL	3 μL																																																					
人BRAF基因rs113488022位点突变型阳性对照(1×10E4拷贝/μL)				3 μL	3 μL																																																				
过程	温度	时间																																																							
预变性	95℃	5 min																																																							
PCR反应 (40个循环)	95℃	15 sec																																																							
	60℃	30 sec																																																							

	72℃	30 sec (采集FAM和CY5通道的荧光信号, 淬灭基团均为BHQ)
--	-----	--------------------------------------

四、数据处理

- 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。如果突变型PC没有FAM扩增信号 (有标准的倒S扩增曲线, 下同), 或野生型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 (突变型PC有FAM扩增信号, 野生型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。
- 如果荧光定量PCR仅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FAM值/CY5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:



- 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35, 则算FAM信号有扩增。如果Ct大于35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	突变型

		有扩增	有扩增	杂合子	
		无扩增	有扩增	野生型	
		无扩增	无扩增	阴性PC或无效数据	