

人 ABCB1 基因 3435C>T (I1145I) 位点 探针法 PCR 分型试剂盒

CAT#:BN65320

低温运输, -20℃保存

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/ μ L。
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 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 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
2 $\times$ 点突变 Probe qPCR MasterMix	60001	0.5 mL
超纯水	60002	1 mL
人 ABCB1 3435CT 分型 引物-探针干粉	65320-3	50 次
人 ABCB1 3435C 阳性对照 (1E4 拷贝/ μ L)	65320-4	250 μ L
人 ABCB1 3435T 阳性对照 (1E4 拷贝/ μ L)	65320-5	250 μ L

本产品仅用于科研

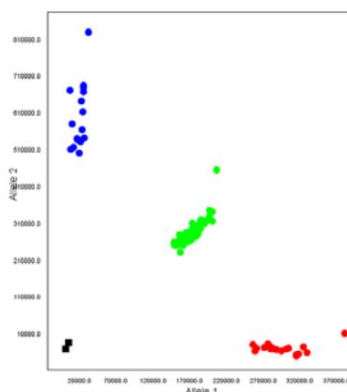
TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

	使用手册	1 份																																										
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）：																																											
	<table><tr><th>成分</th><th>N 个样品管</th><th>ANC 管</th><th>野生型 APC 管</th><th>杂合型 APC</th><th>突变型 APC</th></tr><tr><td>2×点突变 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>人 ABCB1 3435CT 分型引物-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 ABCB1 3435C 阳性对照 (1E4 拷贝/μL)</td><td></td><td></td><td>3 μL</td><td>3 μL</td><td></td></tr><tr><td>人 ABCB1 3435T 阳性对照 (1E4 拷贝/μL)</td><td></td><td></td><td></td><td>3 μL</td><td>3 μL</td></tr></table>		成分	N 个样品管	ANC 管	野生型 APC 管	杂合型 APC	突变型 APC	2×点突变 Probe qPCR 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
	成分	N 个样品管	ANC 管	野生型 APC 管	杂合型 APC	突变型 APC																																						
	2×点突变 Probe qPCR 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：																																												
<table><tr><th>过程</th><th>温度</th><th>时间</th></tr><tr><td>预变性</td><td>95℃</td><td>90 sec</td></tr><tr><td rowspan="2">PCR 反应 (45 个循环)</td><td>95℃</td><td>15 sec</td></tr><tr><td>52℃</td><td>15 sec.</td></tr></table>		过程	温度	时间	预变性	95℃	90 sec	PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 sec	52℃	15 sec.																																
过程	温度	时间																																										
预变性	95℃	90 sec																																										
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 sec																																										
	52℃	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

- 实验有效性的判断: 首先分析 ANC 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 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 Cy5 扩增信号, 或杂合型 APC 没有 FAM 和 Cy5 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 Cy5 扩增信号, 杂合型 APC 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 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。ANC 的 Cy5 值/FAM 值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	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			