

# 人CYP2D6\*10基因c.100C>T(P34S)点突 变探针法qPCR检测试剂盒

货号: BN65371

低温运输, -20℃保存

## 产品及特点

细胞色素P4502D6 (CYP2D6) 是CYP450酶家族的重要成员, 是一种多态酶, 代谢约30%的临床药物, 其在亚洲人群的分布率高达56%。CYP2D6常表现出显著的遗传多态性, 可能导致某些药物的不良反应和治疗失败。因此检测人CYP2D6\*10基因c.100C>T突变具有重要的研究意义。为此本公司开发了专门检测CYP2D6\*10基因c.100C>T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, 分析灵敏度高, 可以达到1000 拷贝/ $\mu$ 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  $\mu$ 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

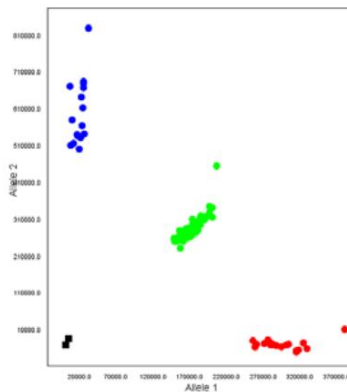
本产品采用5孔盒包装

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 rs1065852位点 检测引物-探针干粉	65371-3	50 次	0.5 mL
人BRAF基因15号外显子 野生型阳性对照(1E4拷贝/ $\mu$ L)	65371-4	250 $\mu$ L	1.5 mL
人BRAF基因rs1065852位点突 变型阳性对照(1E4拷贝/ $\mu$ L)	65371-5	250 $\mu$ L	0.5 mL

本产品仅用于科研

	使用手册		1份	1份																																											
	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12个月。																																														
自备物品	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。																																														
	三、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+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）。																																														
	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）：																																														
	<table><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><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>rs1065852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(1E4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 rs1065852位点突变型 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	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	rs1065852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(1E4拷贝/μL)			3 μL	3 μL		人BRAF基因 rs1065852位点突变型 阳性对照(1E4拷贝/μL)				3 μL	3 μL
	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																																									
	rs1065852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(1E4拷贝/μL)			3 μL	3 μL																																											
人BRAF基因 rs1065852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：																																															
<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>60℃</td><td>60 sec（采集FAM和Cy5通道的荧光信号，淬灭基团均为TAMRA）</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	60℃	60 sec（采集FAM和Cy5通道的荧光信号，淬灭基团均为TAMRA）																																
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）																																													
五、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。
7. 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：



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