

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

CAT#:BN65406

低温运输，-20℃保存

产品及特点	EGFR 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。在 DNA 水平，EGFR 基因的 2573T>G 突变和 2574G>T 突变均可导致 EGFR 蛋白质的 L858R 突变，但前者更为常见，为此本公司开发了简单快捷的检测 2573T>G 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/μL。 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 EGFR 基因 rs121434568 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 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

本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

成分	编号	规格	包装
2 × Probe qPCR MasterMix	60001	0.5 mL	0.5mL
超纯水	60002	1 mL	1.5 mL
rs 121434568 位点检测引物-探针干粉	65406-3	50 次	1.5 mL
rs 121434568 位点野生型阳性对照(1 × 10E4 拷贝/μL)	65406-4	250 μL	0.5 mL
rs 121434568 位点突变型阳性对照(1 × 10E4 拷贝/μL)	65406-5	250 μL	0.5 mL
使用手册		1 份	无

注意：使用前需要在引物探针干粉管中加入 216 μL 的超纯水，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。

自备试剂

样品 DNA。

使用方法

一、样品 DNA 的制备

- 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。
- 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)

- 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（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）：

成分	样品管 N 个	扩增 NC	野生型 PC	杂合型 PC	突变型 PC
2 × Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
rs 121434568 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
rs 121434568 位点野生型阳性对照(1 × 10E4 拷贝/μL)			3 μL	3 μL	
rs 121434568 位点突变型阳性对照(1 × 10E4 拷贝/μL)				3 μL	3 μL

本产品仅用于科研

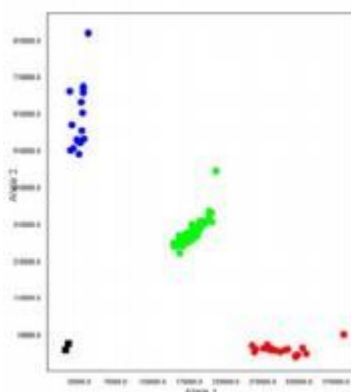
TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

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℃	5 min
PCR 反应 (40 个循环)	95℃	15 sec
	60℃	60 sec (采集 FAM 和 HEX 通道的 荧光信号，淬灭基团均为 MGB)

四、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 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 PC。如果野生型 PC 没有 FAM 扩增信号（有标准的倒 S 扩增曲线，下同），或突变型 PC 没有 HEX 扩增信号，或杂合型 PC 没有 FAM 和 HEX 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（野生型 PC 有 FAM 扩增信号，突变型 PC 有 HEX 扩增信号，杂合型 PC 有 FAM 和 HEX 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 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。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 HEX 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。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	