

人 CYP3A4*1G 基因 25343G>T 点突变探针法 qPCR 检测试剂盒

目录号: ml108006

使用说明书

产品及特点

CYP 酶是体内重要的药物代谢酶，分为 CYP1, 2, 3 等家族，然后分别分为 A, B, C 等亚家族，末尾再接一个数值表示具体的亚型的酶，如 CYP3A4 是 CYP3A 亚家族中的重要一员，其活性在人类肝脏中占总 CYP 活性的 60%，同时其在人体十二指肠、空肠和回肠中均有表达。CYP3A4*1G 是目前已发现的中国人所有的 CYP3A4 单核苷酸多态性中发生频率高的一个位点，是具有功能意义的突变。研究显示该基因多态性可能影响 CYP3A4 酶活性。因此研究 25343G>T 突变具有重要的研究意义，为此本公司开发了专门检测 25343G>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 CYP3A4*1G 基因 25343G>T 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

成分	规格	包装
2×点突变 Probe qPCR MasterMix	0.5 mL	0.5 mL 本色管
超纯水	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
人 CYP3A4*1G 基因 25343G>T 位点检测 引物-探针混合液干粉	50 次	0.5 mL 白盖管
人 CYP3A4*1G 基因野生型 阳性对照(1×10^4 拷贝/ μ L)	250 μ L	1.5 mL 棕色管
人 CYP3A4*1G 基因 25343 位点突变型 阳性对照(1×10^4 拷贝/ μ L)	250 μ L	0.5 mL 黄盖管
使用手册	1 份	无
本产品采用五孔盒包装		
注意： 使用前需要在引物探针干粉管中加入 160 μ L 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。		

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 溶解在 TE 中，并需要用 NanoDrop 进行定

量。浓度不能低于 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

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. 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)。

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加)) :

成分	样品管 N 个	扩增 NC	野生型 PC	杂合型 PC	突变型 PC
2×点突变 Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
人 CYP3A4*1G 基因 25343G>T 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 CYP3A4*1G 基因野生型 阳性对照(1×10E4 拷贝/ μL)			3 μL	3 μL	
人 CYP3A4*1G 基因 25343 位点突变型 阳性对照(1×10E4 拷贝/ μL)				3 μL	3 μL

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°C	90 sec.
PCR 反应	95°C	15 sec.

(45 个循环)

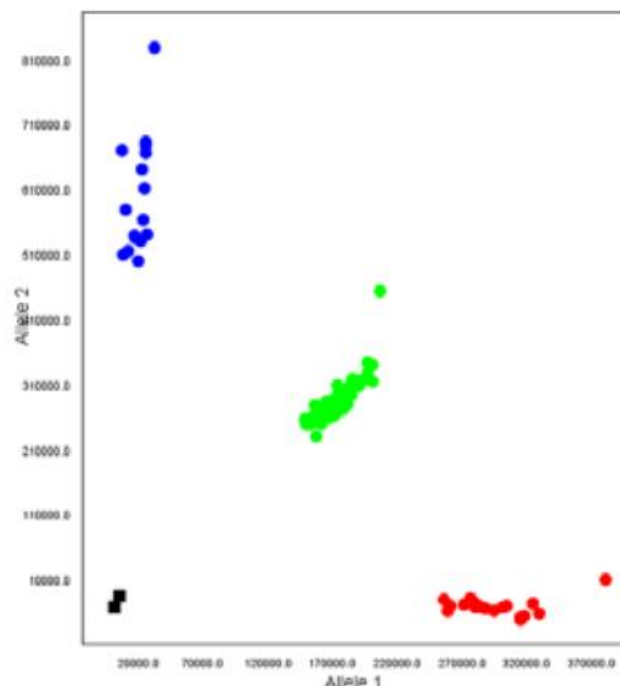
60°C

60 sec (采集 FAM 和 HEX 通道的荧光信号, 淬灭基团均为 TAMRA)

三、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

自备试剂

样品 DNA。

运输及保存

低温运输, -20℃保存, 有效期 1 年。