

人类 B-raf 基因 V600E 突变检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】

通用名称：人类 B-raf 基因 V600E 突变检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

20 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定性检测人非小细胞肺癌、结直肠癌肿瘤石蜡包埋组织切片提取的基因组 DNA 中的肿瘤组织 B-raf 基因 V600E 点突变。

B-raf 基因位于染色体 7q34，是一种癌基因，属 RAF 基因家族，有 18 个外显子，编码一种含 783 个氨基酸的 B-raf 蛋白，是 EGFR 通路 RAS/RAF/MEK/MRK/MAPK 中重要的转导因子，参与调控细胞生长、分化和凋亡等多种生理过程。

针对 EGFR 的肿瘤靶向药物通过抑制该途径发生药理作用。研究表明在非小细胞肺癌、结直肠癌等多种恶性肿瘤中存在 B-raf 基因突变，其中第 15 外显子上 V600E 点突变最常见，约占所有突变的 90%以上，该突变导致 B-raf 蛋白被异常激活，从而使患者接受 EGFR-TKI 药物和 EGFR 单抗类药物治疗失效。据中国 2010 版《肿瘤学临床实践指南》建议，对 K-ras 基因检测正常的非小细胞肺癌和结直肠癌患者，应进一步检查 B-raf 基因的突变状态，以指导靶向药物治疗方案。本公司尚无临床实例证实 B-raf 基因突变与靶向药物的相关性，其相关性主要来自文献报道，因此本试剂盒检测结果仅用于辅助临床医生对非小细胞肺癌、结直肠癌肿瘤患者制定用药方案。

【检验原理】

本试剂盒基于实时荧光 PCR 平台，结合等位基因特异性扩增（ARMS）技术、野生型基因扩增抑制技术和多重 PCR 技术检测 B-raf 基因 V600E 突变。ARMS 技术是指 PCR 引物的 3'末端位碱基必须与其模板 DNA 互补才能有效扩增，通过设计特异性 ARMS 引物，对存在 V600E 突变的 B-raf 基因靶序列进行 PCR 扩增放大，并利用 FAM 基团标记的 Taqman 探针对扩增产物进行检测。因为采用了野生型基因扩增抑制剂，使 ARMS 体系能够耐受更高浓度的背景野生型 B-raf 基因，降低了试剂盒对基因组样本的 DNA 浓度要求，提高了检测灵敏度。

为质控扩增体系的有效性，试剂盒设置了内质控和外质控，内质控基因是人类基因组的一个保守片段，长度与 B-raf 目标片段相似，均为 100bp 左右，内控探针采用标记 ROX 基团的 Taqman 探针对内控基因扩增产物进行检测。内控引物、探针及内控基因对 ARMS 体系的扩增效率无影响。阳性对照品是 B-raf 基因 V600E 突变质粒与野生型人类基因组 DNA 的混合物，用于 PCR 扩增的外质控。

【主要组成成分】

本试剂盒包含 PCR 反应液 I、PCR 反应液 II 和阳性对照品等 3 管试剂。

PCR 反应液 I 体积 350μL，包含一对 B-raf 基因 V600E 突变检测引物和一对内控引物、标记 FAM 基团的用于检测突变 B-raf 基因的 Taqman 探针和标记 ROX 基团的用于检测内控基因的 Taqman 探针，各引物和探针浓度均为 20-100pM；野生型基因扩增抑制物，浓度为 1200pM；

PCR 反应液 II 体积 100μL，包含 0.1U/μL Taq 酶和 50nM dNTP、750nM Mg²⁺ 等；

阳性对照品体积 20μL，包含 300copies/μL 的 B-raf 基因 V600E 突变质粒和 10ng/μL 的野生型人类基因组（3000copies/μL）。

检测必须但试剂盒中不包含的组分：

1.5mL 离心管（用于配制 PCR 反应液和 DNA 提取）；

0.2mL PCR 管或 8 联 PCR 管或 96 孔 PCR 板；

带滤塞的吸头（1mL、200μL 和 10μL）；

DNA 提取试剂盒 ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System（货号：A2352）。

【储存条件及有效期】

置于-20℃条件下储存，有效期 6 个月。

“生产日期”见各组份标签“批号”项，“有效期至”见试剂盒标签。

4~10℃避光条件下储存或运输不得超过 7 天。

【适用仪器】

适用于 ABI7500、Linegene FQD-96A 型号的 Real-time PCR 扩增仪。

【样本要求】

1. 适用样本为非小细胞肺癌、结直肠癌石蜡包埋病理组织切片，切片厚度 10μm，数量 1 片，所用切片样品保存不超过 3 年。

2. 由于肿瘤的复杂性，所采集的临床样品往往会混有正常组织细胞，石蜡包埋病理切片样品肿瘤病变细胞应不低于 10 %，所取部分应尽量在蜡块中部。
3. 使用商业化的试剂盒来提取人类基因组 DNA，推荐使用 Promega 公司的 ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (A2352) 提取石蜡包埋组织切片样品，所提 DNA 需用紫外分光光度计测定浓度和纯度，其 DNA OD260/OD280 的值应在 1.8~2.0，浓度应在 5~50ng/μL 之间，样本 DNA 质量不合格者不得用于检测，建议低于 5ng/μL 者重新取切片进行核酸提取，高于 50ng/μL 者予以适当稀释至规定的浓度范围，提取完的 DNA 建议立即进行检测，否则请于-20℃以下保存，保存时间不要超过 6 个月。

【检验方法】

一、核酸提取（样本处理室）

使用 ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System 进行核酸提取，提取步骤如下：

1. 用矿物油去除石蜡
加矿物油 500μL 到装有组织切片样本的 1.5mL 离心管内，80℃孵育 1min，振荡混匀；
2. 组织样本裂解，消化组织蛋白质
 - 1) 离心管内加入 200μL 裂解液，室温 10,000g 离心 15s，形成水油两相溶液，下层为水相，上层为油相；
 - 2) 向离心管水相加入 20μL 蛋白酶 K，用移液枪吸打混匀；
 - 3) 56℃孵育 1h；
 - 4) 80℃孵育 1h；
 - 5) 冷却到室温，离心 15s；
3. 去除 RNA
向离心管水相加入 10μL RNase A，吸打混匀。室温（20~25℃）孵育 5min；
4. 用核酸提取柱提取基因组 DNA
 - 1) 加入 220μL BL Buffer 到含裂解样品的离心管中，再加入 240μL 乙醇（95~100%），震荡混匀，室温 10,000g 离心 15s，形成水油两相溶液，下层为水相，上层为油相；
 - 2) 将结合柱置于收集管内，小心吸取离心管下层水相（包括可能形成的沉淀）转移到结合柱内，盖上管盖，将离心管丢弃；
 - 3) 收集管室温 10,000g 离心 30s，弃去管中的滤出液；
 - 4) 把柱子重新装入收集管中，加入 500μL 1 × 洗涤液至柱内，室温 10,000g 离心 30 s，弃去滤出的洗涤液；
 - 5) 重复步骤 4) 再洗涤一次；
 - 6) 打开结合柱盖子，室温条件下 16,000g 离心 3 min 以甩干柱内残余的液体；
 - 7) 把柱子转移至一个干净的自备 1.5mL 离心管中，向柱内加入 50μL Elution Buffer，室温 16,000 g 离心 1 min 洗脱基因组 DNA，丢弃提取柱。

注意事项：

1. 操作提取柱和收集管时应戴好一次性手套；
2. 收集基因组 DNA 前的 16,000g 离心 3 min 操作必须开盖，以除净乙醇，乙醇残留过量将严重影响基因组的收集质量。

二、试剂准备（试剂准备室）

将试剂从冰箱取出，室温融化，混匀，1000rpm 快速离心 20 秒，备用；

三、反应体系配制（试剂准备室）

1. 根据检测样本数计算所需反应数，如样本数为 n，则需做 n+2 个反应（包含一个阳性对照反应和一个无模板对照反应）；
2. 根据表 1 计算所需各反应液的体积，并配制反应体系，反应体系混匀后 3000rpm 快速离心 30 秒，分装至 PCR 管中，每管 18μL；

表 1 加样表

组分	1 反应 (μL)	N 个反应 (μL)
PCR 反应液 I	14	14 × N
PCR 反应液 II	4	4 × N
总体积	18	18 × N

四、加样（样本处理室）

取 2μL 提取的样品 DNA 加入 PCR 反应管，盖上管盖，1000rpm 离心或轻甩，排除管底气泡；阳性对照反应所用模板为试剂

盒中对照品，空白对照反应所用模板为超纯水（自备）。

五、上机检测（扩增室）

1. 将 PCR 管按顺序放入 PCR 仪，按表 2 设置反应程序；

表 2 反应程序

阶段	温度	时间	检测荧光	循环数
预变性	95℃	2min		1
循环段 1	95℃	5sec		10
	52℃	30sec		
	72℃	15sec		
循环段 2	93℃	3sec		35
	56℃	30sec	√	
	60℃	30sec		

注：在循环段 2 的 56℃时检测 FAM、ROX 两个通道的荧光。

2. 运行 PCR 反应程序，保存文件。

六、结果获取

荧光定量 PCR 仪运行结束后，使用配套软件对本次试验的结果进行分析。

【阳性判断值】

以扩增过程前 3~15 循环的荧光值的 10 倍标准差为阈值，以荧光值超过阈值的循环数为阈值循环数（Ct 值）。

【检验结果的解释】

- 空白对照应在 FAM 和 ROX 通道均无 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线升起；若空白对照管在至少一个通道有典型的 S 型扩增曲线升起，可能为试剂受到污染或操作过程中的污染，请排除污染源后重新检测；
- 阳性对照应在 FAM 和 ROX 通道均有典型的 S 型扩增曲线升起，且 Ct 值在 12~25 间；若对照品有至少一个通道无典型的 S 型扩增曲线升起或 Ct 值≤12 或 Ct 值≥25，该批次样本需重新检测，请确认所使用的试剂是否仍在有效期内，确定操作是否严格按照说明书进行；
- 若满足 1 和 2 要求，表明此次实验成功，对样品管进行分析：
 - 内控（ROX 通道）应有典型的 S 型扩增曲线升起，且 Ct 值 10~22 之间，表明所加样本 DNA 质量正常，若 Ct 值≤10，表明所加样本过量，请将样本稀释后再次检测；若 Ct≥22 或无扩增（无 Ct），表明所加样本 DNA 含有 PCR 抑制剂或 DNA 量不够，可能影响低突变率样本的检测结果，请重新提取 DNA 后检测；
 - 样本突变信号（FAM 通道）有典型的 S 型扩增曲线升起，且 Ct 值≤32，则判定该样本 B-raf 基因 V600E 突变阳性；
 - 样本突变信号（FAM 通道）无典型的 S 型扩增曲线升起，或 Ct 值大于 32，则判定该样本 B-raf 基因 V600E 突变阴性。

【检验方法的局限性】

本试剂盒仅适用于规定的仪器和检测系统，检测结果仅供临床参考，不得作为临床诊治的唯一依据。

【产品性能指标】

- 经 1050 例非小细胞肺癌和结直肠癌肿瘤组织样本临床试验，本品与测序法作对照，阳性符合率为 97.9%，阴性符合率为 96.8%，总符合率为 97.1%。
- 试剂盒应外观清洁、无泄漏、无破损，标志、标签字迹清楚；各组分融化后应澄清透明，无色，无沉淀。
- 检测 10 份阳性参考品，阳性参考品符合率应为 100%。
- 检测 10 份阴性参考品，阴性参考品符合率应为 100%。
- 可以检出 10ng 野生型基因组 DNA 背景下，含量低至 1%的 B-raf 基因 V600E 突变。
- 用 2 份企业内部精密性参考品分别作 10 次平行检测，结果均为阳性且 Ct 值变异系数 CV≤5%。
- 2g/L 血红蛋白、342μM 胆红素和 37mM 脂类（甘油三酯）等干扰物质，对检测结果未见有干扰。

【注意事项】

- 本试剂盒仅用于体外研究。实验前请仔细阅读说明书。
- PCR 检测应在有资质的临床 PCR 实验室进行，实验室应严格按照卫生部《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》

卫办医政发〔2010〕194号文件规定进行资质认定和管理。

3. 实验过程中必须使用专用的移液枪和一次性带滤塞的加样吸头。
4. PCR 操作各阶段应在不同的分区进行，分别为试剂准备室、样本处理室和 PCR 扩增室。人、物单向流动。PCR 试剂盒不应存放在样本处理区。
5. 加样时应使样品完全落入反应液中，不应有样品粘附于管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。
6. PCR 操作各阶段使用专用的仪器和设备。
7. 扩增完毕立即取出反应管，密封在专用塑料袋内，丢弃于指定地点。
8. 实验前及实验完毕后应该对实验室进行紫外线消毒，并用 70%乙醇擦拭工作台和微量加样器。
9. 试剂盒各组份应在有效期内使用，不同批次的试剂盒成分不得混用。

【参考文献】

1. 程张军等, Braf 基因突变与消化道肿瘤, 东南大学学报(医学版)[J], 2006, 25(3): 218
2. 陈龙, 韩盛玺, Braf 基因与结肠癌的关系及临床意义, 实用医院临床杂志[J], 2009, 6(3): 123
3. 周智勇, Braf 基因突变检测方法及其与结直肠癌关系的研究进展, 胃肠病学[J], 2008, 13(3): 187
4. 李振杰, 王颜刚, 甲状腺乳头状癌中 BRAF V600E 点突变的研究, 中国中医药咨讯[J], 2010, 2(9): 144
5. 朱琰琰等, 中国黑色素瘤患者 BRAF 基因突变分析, 临床肿瘤学杂志[J], 2009, 14(7): 585
6. Anne Jarry et al. Real-time allele-specific amplification for sensitive detection of the BRAF mutation V600E, Molecular and Cellular Probes[J], 2004, 18: 349
7. Nathalie Dhomen, Richard Marais, New insight into BRAF mutations in cancer Current Opinion in Genetics & Development [J], 2007, 17: 31
8. Yanying Shen et al. KRAS and BRAF mutations in prostate carcinomas of Chinese patients, Cancer Genetics and Cytogenetics[J], 2010, 198: 35

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 无锡锐奇基因生物科技有限公司

住所: 无锡市滨湖区马山梅梁西路 88 号-A6

联系方式 电 话: 0510-85998856

传 真: 0510-85998276

网 址: www.riqigen.com

售后服务单位名称: 无锡锐奇基因生物科技有限公司

联系方式 电 话: 0510-85998856

传 真: 0510-85998276

网 址: www.riqigen.com

生产地址: 无锡市滨湖区马山梅梁西路 88 号一期 3 号楼第 3 层、GLP 楼第 5 层

生产许可证编号: 苏食药监械生产许 20120026 号

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】

国械注准 20173401183

【说明书核准日期及修改日期】

2017 年 6 月 29 日