

人类 K-ras 基因突变检测试剂盒（PCR-熔解曲线法）说明书

【产品名称】

通用名称：人类 K-ras 基因突变检测试剂盒（PCR-熔解曲线法）

【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 K-ras 基因第 12，13 密码子的 12 种体细胞突变（表 1）。

表 1 本品可检测的 K-ras 基因突变

K-ras 基因 12 密码子突变		K-ras 基因 13 密码子突变	
Gly12Ser	<u>GGT</u> > <u>AGT</u>	Gly13Ser	<u>GGC</u> > <u>AGC</u>
Gly12Arg	<u>GGT</u> > <u>CGT</u>	Gly13Arg	<u>GGC</u> > <u>CGC</u>
Gly12Cys	<u>GGT</u> > <u>TGT</u>	Gly13Cys	<u>GGC</u> > <u>TGC</u>
Gly12Asp	<u>GGT</u> > <u>GAT</u>	Gly13Asp	<u>GGC</u> > <u>GAC</u>
Gly12Ala	<u>GGT</u> > <u>GCT</u>	Gly13Ala	<u>GGC</u> > <u>GCC</u>
Gly12Val	<u>GGT</u> > <u>GTT</u>	Gly13Val	<u>GGC</u> > <u>GTC</u>

K-ras 基因位于染色体 12p12.1，是重要的癌基因之一，编码一种 21kD 的 kras 蛋白，参与细胞内的信号传递，主要包括 RAS/PI3K/PTEN/AKT 和 RAS/RAF/MEK/ERK 信号转导途径，这些转导途径是当前肿瘤靶向药物研究的热点，靶向药物通过抑制这些途径发生药理作用。研究表明，非小细胞肺癌、结直肠癌组织存在 K-ras 基因突变，K-ras 基因第 12 和 13 密码子发生突变，将导致 kras 蛋白变异并处于持续激活状态，使药物失效。据中国 2010 版《肿瘤学临床实践指南》，在一项包含 101 例肺腺癌亚型细支气管肺泡癌患者的回顾性研究中，所有患者均接受厄洛替尼单药一线治疗。K-ras 突变者无一例缓解（0/18），而无 K-ras 突变者则有 20 例缓解（20/62，32%），差别有统计学意义（ $P < 0.01$ ）。指南建议，非小细胞肺癌和结直肠癌患者使用靶向药物前应进行 K-ras 基因突变状态的检测。本品适用于进入个体化靶向治疗前的非小细胞肺癌、结直肠癌患者使用，为临床肿瘤靶向药物的个体化用药提供辅助诊断依据。

【检验原理】

本试剂盒基于实时 PCR 平台，结合了特异引物、荧光探针和熔解曲线技术，定性检测 DNA 样品中 K-ras 基因 12，13 密码子是否存在突变。用一对 K-ras 基因特异引物，该引物可均等地扩增 12 种突变型，也可扩增野生型的 K-ras 目标序列，利用标记了 FAM 荧光基团和淬灭基团的双标记探针一方面抑制野生型基因的扩增，提高突变基因的检测灵敏度，另一方面在扩增后用熔解曲线法实现对扩增产物的分析，荧光探针在未杂交时因荧光基团和淬灭基团相互接近而被淬灭，不发荧光，杂交状态时，二者相互离开而产生荧光。该荧光探针分别与突变基因和野生型基因的杂交产物在熔解曲线分析时，表现为熔解曲线导数图中出现不同位置的峰，熔解峰对应的位置即为熔解温度（ T_m 值），因野生峰的位置较突变峰位置大 3℃ 以上而得到区分，但各种突变峰因 T_m 值相差较小而不能辨别。

本品可稳定地检出野生型 10ng/μL 基因组背景下 1% 含量的体细胞突变，其熔解曲线会出现双峰，其中突变峰较野生峰 T_m 值明显降低（图 1）。

【主要组成成分】

本试剂盒包含 PCR 反应液 I、PCR 反应液 II 和野生型对照品等 3 管试剂。PCR 反应液 I 包含相应的 K-ras 基因突变检测引物和探针，探针由 FAM 荧光指示；PCR 反应液 II 含有 dNTP、Taq 酶和 $MgCl_2$ 等。

表 2 试剂盒组成

试剂组分	体积	主要成分
PCR 反应液 I	350μL	25~125pM 的引物和探针
PCR 反应液 II	100μL	0.1U/μL Taq 酶和 30mM dNTP、750mM Mg^{2+} 等
野生型对照品	20μL	10ng/μL 野生型基因组 DNA

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”见各组分标签“批号”项，“有效期至”见试剂盒标签。

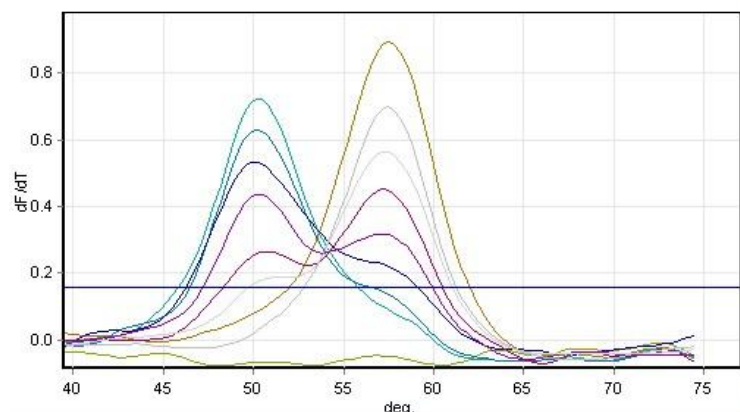


图 1 系列阳性样本的检测结果

注：左峰为突变峰，右峰为野生峰

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 30s，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（包含一个阴性对照反应和一个无模板对照反应）；
2. 根据表 3 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 3 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；阴性对照反应所用模板为试剂盒中野生型对照品，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，设置反应程序

(1) LineGene FQD-96A 荧光定量 PCR 仪程序设置

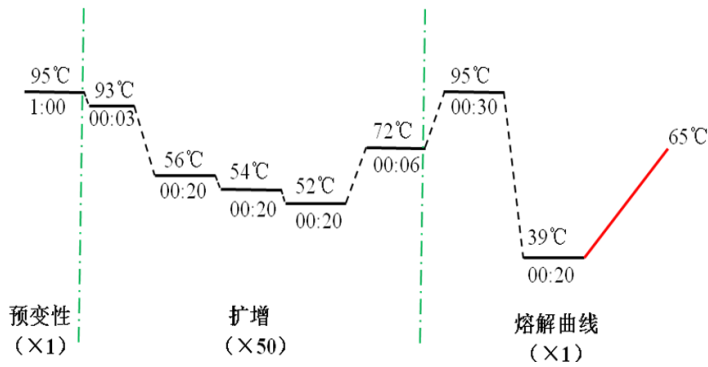


图 2 LineGene FQD-96A PCR 仪反应参数设置图

- 在 52℃时收集荧光，荧光检测通道选择 FAM 检测通道，该荧光参数用于质控使用本仪器重复检测的精密度。
- Melt 分析时，目标温度 65℃，起始温度 39℃，台阶温度 1℃，台阶温度维持 30s，荧光采集方式为“台阶”。荧光检测通道选择 FAM 检测通道。

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熔解曲线导数图（-dF/dT）分析。

【阳性判断值】

以野生型对照品反应管为参照，以野生型对照峰峰高的 1/5 划定阈值线。

【检验结果的解释】

- 空白对照在 Linegene FQD-96A 中应无明显熔解峰，若分析后出现明显熔解峰，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；在 ABI7500 中，空白对照荧光变化曲线（Normalized Reporter）应为逐渐上升的一条斜线，（如图 4），若出现荧光值下降的熔解特征曲线，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；
- 野生型对照管在熔解曲线分析后应有单独熔解峰，若野生型对照管无熔解峰，或出现 2 个或 2 个以上熔解峰，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：
 - 样品管只出现单独熔解峰，且 Tm 值在野生型对照管熔解曲线峰 Tm±1 范围内，该样本判定为阴性（野生型，图 5）；
 - 样品管只出现单独熔解峰，且 Tm 值小于野生型对照管熔解曲线峰 Tm 值 3℃ 以上，则该样本判定为阳性（突变型，图 5）；
 - 样品管出现两个熔解峰，且两个熔解峰分别符合（1）和（2）的要求（图 6A），或样品管出现一个宽峰（左右各有一个高点，可以判为峰值，但两峰间平缓过渡，凹陷不明显，见图 6B、6C 和 6D），则该样本判定为阳性（突变型）；
 - 一般情况下不会出现突变峰与野生峰位置相差 3℃ 以内或单一突变峰与野生型对照管的野生峰位置相差 1~3℃ 的情况，如确实发生此种情况，考虑仪器温度控制和传感系统是否发生故障。
 - 样品管在熔解曲线分析中无明显熔解曲线峰，可能为 DNA 样本中存在 PCR 抑制剂或 DNA 量不够，请确认样本质量以及前处理过程是否规范，必要时再行检测。

【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 99.1%，阴性符合率为 95.7%，总符合率为 97.2%。

(2) ABI7500 荧光定量 PCR 仪

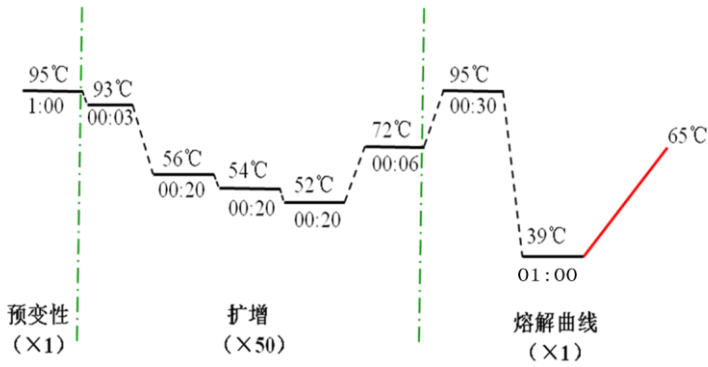


图 3 ABI7500 PCR 仪反应参数设置图

- Melt 分析时，选择 StepAndHold 模式，温度 39~65℃，每个步骤升高 0.3℃，在每个温度都收集荧光。荧光检测通道选择 FAM 检测通道。

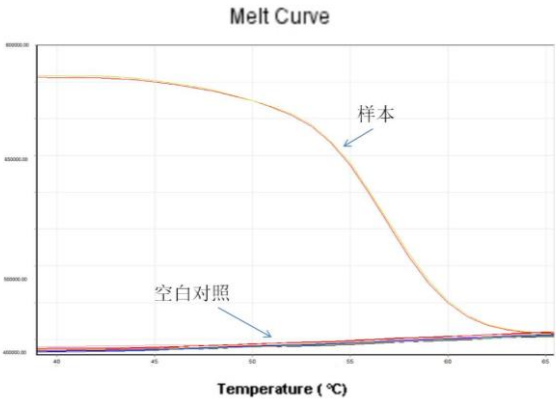


图 4 ABI7500 检测空白对照示意图

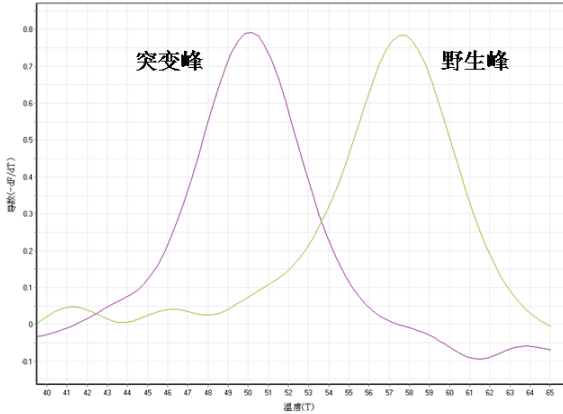


图 5 单独突变峰与野生峰(两样本叠加对照图)

2. 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。
3. 检测 12 份阳性参考品，阳性参考品符合率应为 100%。
4. 检测 10 份阴性参考品，阴性参考品符合率应为 100%。
5. 可以检出 10ng 野生型基因组 DNA 背景下，含量低至 1%的 K-ras 基因突变。
6. 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 $CV \leq 8\%$ 或 Tm 值极差 $\leq 1^\circ\text{C}$ 。
7. 本产品与 Kras 假基因（KRAS1P）、Nras 基因和 Hras 基因不发生交叉反应。
8. 2g/L 血红蛋白、342 μM 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。

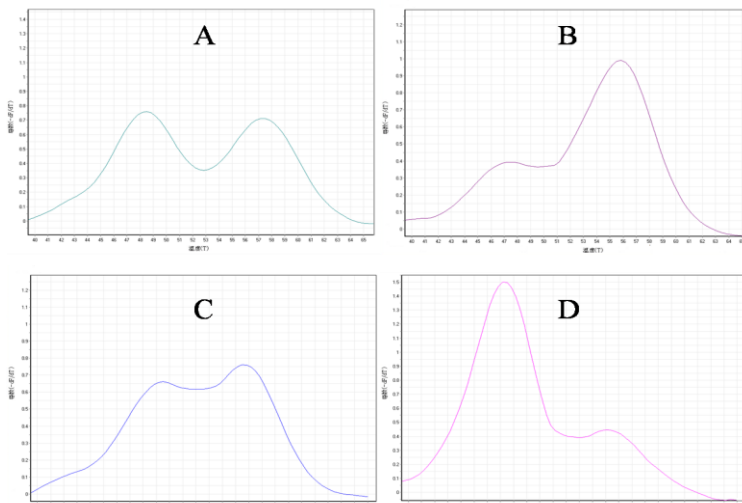


图 6 检测可能出现的双峰及宽峰熔解曲线图

A: 双峰 B、C、D: 宽峰

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外研究。实验前请仔细阅读说明书。
2. 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. 试剂盒各组分应在有效期内使用，不同批次的试剂盒成分不得混用。

【参考文献】

1. 丁淑波, K-ras 基因与结直肠癌, 浙江临床医学[J], 2009, 11 (11): 1233
2. 赵晶莹, 邵春莹, K-ras 基因突变与胰腺癌关系的研究进展[J], 2009, 6 (25): 5
3. 沈永奇等, 结直肠癌不同病变阶段 K-ras 基因突变的研究, 肿瘤[J], 2010, 30 (2): 134;
4. 陈萍等, 非小细胞肺癌 K-ras 基因点突变的研究, 山东医药[J], 2008, 48(34):7;
5. 李沈惠等, 外周血中 EGFR、K-ras 基因突变与吉非替尼、厄罗替尼临床疗效分析, 现代肿瘤医学[J], 2010, 18 (1): 191
6. Takashi Kobunai, et al. The frequency of KRAS mutation detection in human colon carcinoma is influenced by the sensitivity of assay methodology: A comparison between direct sequencing and real-time PCR, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 395:158
7. Jens Neumann, et al. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer Pathology-Research and Practice, 2009, 205:858
8. Doris Mayr, et al. KRAS and BRAF mutations in ovarian tumors: A comprehensive study of invasive carcinomas, borderline tumors and extraovarian implants, Gynecologic Oncology, 2006, 103:883

【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 20173401187

【说明书核准日期及修改日期】 2017 年 6 月 29 日