

人 K-ras 基因 8 种突变检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

[产品名称]

通用名称：人 K-ras 基因 8 种突变检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

[包装规格] 24 人份/盒

[预期用途]

该产品用于体外定性检测人石蜡包埋病理切片组织中提取 DNA 的 K-ras 基因 12 和 13 密码子 8 种突变（表 1）。

表 1 人 K-ras 基因 12 号密码子 6 种突变型、13 号密码子 2 种突变型

Mutation	密码子	Base Change	突变率	Mutation	密码子	Base Change	突变率
Gly12Ala	12	GGT>GCT	1.12%	Gly12Ser	12	GGT>AGT	0.94%
Gly12Asp	12	GGT>GAT	7.02%	Gly12Val	12	GGT>GTT	4.75%
Gly12Arg	12	GGT>CGT	0.67%	Gly13Asp	13	GGC>GAC	2.53%
Gly12Cys	12	GGT>TGT	2.33%	Gly13Cys	13	GGC>TGC	0.17%

突变率统计来源于 Sanger 数据库 (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>)

人类有 17%~25%肿瘤带有突变的 K-ras 基因，其在肺癌患者中的突变率为 15~30%，在结直肠癌患者中的突变率为 20~50%(数据来源于 Sanger 数据库)。因为 K-ras 基因编码的 P21 蛋白位于 EGFR 信号通路下游，K-ras 基因突变后，下游信号通路始终处于激活状态，不受上游靶向药物对 EGFR 的影响，导致细胞持续恶性增殖。K-ras 基因突变一般会使肺癌患者对 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂产生耐药，使结直肠癌患者对抗 EGFR 抗体类药物产生耐药^[1, 2, 3]。2008 年美国国立综合癌症网络（NCCN）发布的结直肠癌临床实践指南指出导致 K-ras 处于激活状态的突变部位主要是位于外显子 2 的密码子 12 和 13，并推荐所有晚期转移结直肠癌患者在用药前进行 K-ras 突变检测^[4]。因此快速、准确的检测出 K-ras 基因突变在临床用药指导方面具有重要意义。本试剂盒以 DNA 为检测样本，提供突变状态的定性评估，可辅助临床医生筛选出受益于靶向药物的结直肠癌、肺癌等肿瘤患者。试剂盒检测结果仅供临床参考，不应作为患者个体化治疗的唯一依据，临床医生应结合患者病情、药物适应症、治疗反应及其他实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

[检验原理]

本检测试剂盒采用针对野生型序列的特异阻断技术与 Taqman 探针相结合方法检测位于人 12 号染色体 K-ras 基因 2 号外显子的 8 种热点突变。Taqman 探针分别标记一个报告荧光基团 FAM 和一个淬灭荧光基团 BHQ2。探针完整时，报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收；PCR 扩增时，Taq 酶的 5'→3' 的外切酶活性将探针酶切降解，使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离，从而荧光监测系统可接收到荧光信号。K-ras 检测反应液中含有的阻断成分，通过特定的 PCR 反应程序，可特异性阻断野生型扩增，突变

型扩增不受影响，Taqman 探针与突变型扩增产物结合，在实时 PCR 平台上实现对样品 DNA 中突变的检测。

检测体系中含有一定比例的 dUTP、dNTP 和尿嘧啶 DNA 糖基化酶（UDG 酶），这种酶（也称为尿嘧啶-N-糖基化酶或 UNG 酶）可以打断含有 dUTP 的 PCR 产物，从而有效的防止 PCR 污染。

内参反应液选择的检测区域是人 K-ras 基因相对保守的区段，约 150bp，作为对试剂、DNA 质量以及操作本身的质控，即便 DNA 有降解，通过内参能够真实地反应体系中基因有效的 DNA 量。

[主要组成成分]

编号	组成成分（24 人份/盒）	规格	组成说明
1	内参反应液	660 μ L/支	核酸反应液及检测 K-ras 保守区域引物、探针
2	核酸反应液 A*1	660 μ L/支	内切酶、核酸反应液及检测 Gly12 突变的引物、探针
3	核酸反应液 B*2	660 μ L/支	核酸反应液及检测 Gly13 突变的引物、探针
4	强阳性对照品	120 μ L/支 x1	Gly12、Gly13 突变基因及野生型 DNA
5	弱阳性对照品	60 μ L/支 x1	Gly12、Gly13 突变基因及野生型 DNA
6	空白对照品	120 μ L/支	3%甘油生理盐水溶液

*1 核酸反应液 A 可检测 K-ras 基因 12 号密码子 6 种突变，但不区分具体突变型；

*2 核酸反应液 B 可检测 K-ras 基因 13 号密码子 2 种突变，但不区分具体突变型；

注：不同批号试剂盒中各组份不可以互换。

需自备试剂：无 RNase 和 DNase 纯水、无水乙醇、二甲苯；检测样本为石蜡包埋组织样本，推荐使用 QIAGEN 生产的“QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Cat. No. 56404)”或天根生产的“石蜡包埋组织基因组提取试剂盒(Cat. No. DP331) 。

需自备耗材：无 RNase 和 DNase Tip 头、一次性手套、1.5ml 无 RNase 和 DNase 离心管，荧光定量 PCR 八联反应管、移液器、离心机。

[储存条件及有效期]

本试剂盒应储存于-18℃ 以下的避光条件下，有效期 9 个月。生产日期及有效期见试剂盒组分标签。

反复冻融次数不得多于 4 次。开瓶后，请于 3 个月内使用完，开瓶次数不超过 4 次。可采用干冰或冰袋在低温避光条件下运输。

[适用仪器]

ABI 7500/7300/Stepone/Stepone plus 荧光定量 PCR 仪。

[样本要求]

石蜡包埋病理组织或切片样品应确定含有肿瘤病变细胞，所取部分尽量在蜡块中部，石蜡切片数不应

少于 3 张，厚度在 5~10 μ m。且手术切除的组织应尽快在 4~10%的福尔马林中固定，固定时间以 8~24 小时为宜；包埋前应进行彻底脱水。所用石蜡包埋病理组织或切片样品一般请选择保存尚未超过 3 年的样品。

[检验方法]

1 DNA 提取

对于石蜡包埋组织样本，推荐使用 QIAGEN 生产的“QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Cat. No. 56404)”或天根生化科技（北京）有限公司生产的“石蜡包埋组织基因组提取试剂盒(Cat. No. DP331)”，严格按照说明书提取。

最后用无 RNase 和 DNase 纯水对样本 DNA 进行洗脱，洗脱体积以 50~100 μ L 为宜。所提 DNA 使用 NanoDrop 1000 Spectrophotometer 或同类仪器进行质量检测。检测样本 DNA 最佳 OD 值范围：A260/A280=1.8~2.0，且最大吸收峰在 A260 处。提取的 DNA 浓度低于 5ng/ μ L 时，应观察最大吸收峰是否在 A260 处，若不在此处，说明样本提取失败，应重新提取。

本试剂盒检测样本 DNA 最佳浓度范围：

石蜡样本：最佳浓度范围为 0.5~10 ng/ μ L；由于石蜡样本片段化严重导致有效检测片段量偏低，应相应提高石蜡样本 DNA 检测浓度。浓度高于 10 ng/ μ L 时，应对样本用无 RNase 和 DNase 纯水稀释至 0.5~10 ng/ μ L 浓度范围内再做检测分析。

2 K-ras 突变检测

2.1 扩增试剂准备（PCR 前准备区）

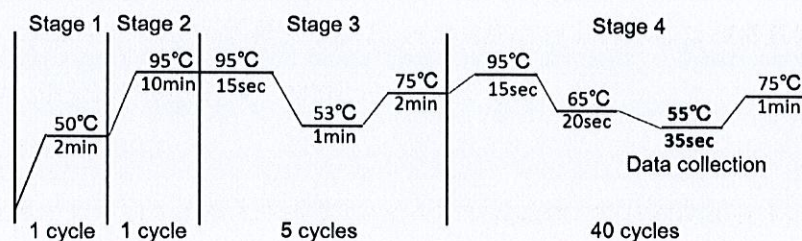
从试剂盒中取出所有核酸反应液，于室温溶解后，反复颠倒 10 次混匀。计算需准备总样品数 n（n=待检样本数+1 管空白对照品+1 管强阳性对照品+1 管弱阳性对照品）。每个样本需 3 个反应体系。向八联反应管中加入各 22 μ L 的检测反应液 A、检测反应液 B、内参反应液。压紧管盖，迅速将其转移至样本处理区，操作应在冰上进行。剩余的核酸反应液立即放入-18 $^{\circ}$ C 以下冻存。

2.2 加样（样本处理区）

在所设定八联反应管中分别加入步骤 1 中提取的 DNA 样本及阳性、空白对照品各 3 μ L，操作应在冰上进行，压紧管盖，2000 rpm 离心 10 sec。记录加样顺序。

2.3 PCR 扩增条件设置（检测区）

设置 PCR 仪的程序，以 ABI 7300/7500 为例：



第一阶段：50℃反应 2 min；

第二阶段：95℃反应 10 min；

第三阶段：95℃ 15 sec，53℃ 1 min，75℃ 2 min，循环 5cycles；

第四阶段：95℃ 15 sec，65℃ 20 sec，55℃ 35 sec（收集荧光），75℃ 1 min，循环 40 cycles。

反应体系设为 25 μ L。

仪器检测通道选择：发光荧光基团为 FAM 荧光素，淬灭荧光基团为 none，参考荧光基团为 ROX 荧光素，具体检测通道设置参照各仪器使用说明。

[参考区间]

采用 ROC 曲线分析的方法对试剂盒检测的临界值进行分析。确定本试剂盒核酸反应液 A 的 Δ Ct 值参考值为 Δ Ct 值 ≤ 10 ， $10 < \Delta$ Ct ≤ 14 为灰度区；核酸反应液 B 的 Δ Ct 值参考值为 Δ Ct 值 ≤ 12 ， $12 < \Delta$ Ct ≤ 14 为灰度区。

[检测结果的解释]

1、判定本次试验是否有效

空白对照品的内参反应液、核酸反应液 A、核酸反应液 B 均无检测曲线升起，强阳性对照品和弱阳对照品的检测曲线正常，且检测 Ct 值满足以下范围时认为本次试验结果有效，可继续分析。

对照品名称	内参反应液	核酸反应液 A	核酸反应液 B
强阳性对照品	Ct ≤ 22	Ct ≤ 22	Ct ≤ 26
弱阳性对照品	26 $\leq$ Ct $\leq$ 32	26 $\leq$ Ct $\leq$ 32	30 $\leq$ Ct $\leq$ 36
空白对照品	0 或无数值	0 或无数值	0 或无数值

注：当空白对照品出现检测信号时，若检测 Ct 值 >35 （可能为加样操作过程出现串孔问题或实验环境中存在人基因组 DNA 气溶胶或实验人员有脱落细胞 DNA 等原因），不影响结果判定；若检测 Ct 值 ≤ 35 ，则建议对实验环境进行清洁后，重新检测。

2、判定样本质量是否符合要求

若样本内参检测呈典型 S 型扩增信号，且 Ct 值小于强阳性对照品的内参检测 Ct 值，说明加入的有效检测 DNA 浓度高于 10ng/ μ L，超出试剂盒检测范围，应对样本稀释至要求浓度进行重新检测。

若样本内参无检测信号或检测 Ct 值大于弱阳性对照品的内参检测 Ct 值，则提示 DNA 提取失败或提取 DNA 量过低、或存在提取样本中含有 PCR 抑制剂，应重新准备样本进行提取 DNA；若样本内参检测 Ct 值小于弱阳性对照品的内参检测 Ct 值，则继续分析结果。

3、分析检测结果

当本次试验满足上述两个条件后，可对待检样本检测结果进行判定。

A)待检样本的核酸反应液 A 和核酸反应液 B 均无扩增信号或检测 Ct 值>38 时或者是无典型 S 型曲线时, 结果判定为阴性;

B)待检样本的核酸反应液 A 和核酸反应液 B 至少一个出现典型 S 型扩增信号时, 且检测 Ct 值<38 时, 则根据 ΔCt ($\Delta Ct = Ct \text{ 核酸反应液 A 或 B} - Ct \text{ 内参}$;) 值判定分析存在突变情况, 具体如下:

a) 若 $\Delta Ct > Cut-off \Delta Ct$ 值, 则判定结果为检测阴性或超出检测范围;

b) 若 $\Delta Ct < Cut-off \Delta Ct$ 值, 则结果判定为检测阳性。

c) 若 $\Delta Ct > Cut-off \Delta Ct$ 值, 且落在检测灰区内, 提示样本中可能含有突变, 但含量较低, 或提取样本中肿瘤细胞含量少, 建议复检或重新提取样本进行复检确认。复检结果仍在检测灰区, 则判定为弱阳性

	核酸反应液 A	核酸反应液 B
阳性	$\Delta Ct \leq 10$	$\Delta Ct \leq 12$
阴性	$\Delta Ct > 14$	$\Delta Ct > 14$
灰区	$10 < \Delta Ct \leq 14$	$12 < \Delta Ct \leq 14$

[检验方法的局限性]

1. 本产品未包含全部的人类 K-ras 基因突变型别。因此, 当本试剂盒检测结果为阴性时, 并不能排除被检测者带有人类 K-ras 基因突变的其他基因突变位点。
2. 本试剂盒仅用于人类 K-ras 基因突变的检测, 不可用于基因分型。
3. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考, 对患者的诊治应结合其症状、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
4. 检测为阴性, 并不代表该患者为突变阴性。阴性结果不能完全排除靶基因突变的存在, 样本中肿瘤细胞过少、核酸过度降解或扩增反应体系中靶基因浓度低于检测限亦可造成阴性结果。不合理的样本采集、转运及处理、样本中肿瘤细胞比例过低、突变的肿瘤细胞比例低等均可导致假阴性结果; 检测的靶序列区域出现变异或者其他原因导致的序列改变可能会导致假阴性结果; 未经验证的其他干扰因素或者 PCR 抑制因子也可能导致假阴性结果, 如 DNA 降解等。
5. 肿瘤组织(细胞)可能存在较大异质性, 不同部位取样可能会得到不同的检测结果。
6. 扩增产物的污染和核酸提取中标本间的交叉污染, 很容易出现假阳性结果。因此, PCR 临床应用必须要有严格的实验室分区、实验室管理和质量控制措施。
7. 本试剂盒仅限于规定的样本类型及检测系统, 即 ABI 7500/7300/Stepone/Stepone plus 荧光定量 PCR 仪, 任何其他厂家的机型尚未经过验证, 不推荐使用本试剂盒进行检测。

[产品性能指标]

1. 试剂盒外观完好, 液体组分清亮、透明、无不溶物。
2. 企业阳性质控品符合率: 核酸反应液 A、B 及内参反应液检测反应液 A 的阳性质控品, A 反应液、内参反应液检测 Ct 值 ≤ 38 , $\Delta Ct (Ct(A \text{ 检测}) - Ct \text{ 内参检测}) < 14$; B 反应液检测的 Ct 值为 0 或无数值; 核酸

反应液 A、B 及内参反应液检测反应液 B 的阳性质控品，B 反应液、内参反应液检测 Ct 值 ≤ 38 ， $\Delta Ct (Ct_{(B)} - Ct_{(内参)}) < 14$ ；A 反应液检测的 Ct 值为 0 或无数值；核酸反应液 A、B 及内参反应液检测内参反应液阳性质控品，内参反应液检测 Ct 值 ≤ 38 ，A、B 反应液检测的 Ct 值为 0 或无数值。

3. 企业阴性质控品符合率：检测企业阴性质控品 N1~N6；A、B 核酸反应液检测 N1-N3 的检测的 Ct 值为 0 或无数值，内参反应液检测 N1~N3 的 Ct 值 ≤ 38 ；A、B、内参反应液检测 N4-N6 的 Ct 值为 0 或无数值。

4. 最低检测限：a) 核酸反应液 A、核酸反应液 B 检测在 $3ng/\mu L$ 野生型背景下，可稳定检出 1% 的突变率；b) 核酸反应液 A、核酸反应液 B 检测在 1% 突变率下，可稳定检出在 1×10^5 Copies/mL 的野生型背景中存在 1×10^3 Copies/mL 的突变。c) 核酸反应液 A、B 和内参反应液检测企业内参最低检测限质控品 SW3，核酸反应液 A 和核酸反应液 B 检测 Ct 值为 0 或无数值，内参反应液检测 Ct 值 ≤ 38 。

5. 精密性：用本试剂盒检测企业精密性质控品，重复检测 20 次，以 Ct 值计算的变异系数 (CV%) $CV \leq 5.0\%$ (n=20)。

[注意事项]

1. 本产品由北京华大吉比爱生物技术有限公司和北京德诺泰克科技有限公司两单位联合研制。

2. 本试剂盒仅用于体外检测。实验前请仔细阅读说明书，有关实验室管理规范严格按照行政主管部门颁布的有关基因扩增检测实验室的管理规定执行。

3. 本试剂盒结果会受到样品本身的来源、样品采集过程、样本质量、样本运输条件、样本预处理等因素影响，同时也受到 DNA 提取质量、荧光定量 PCR 仪型号、操作环境以及当前分子生物学技术的局限性等限制，可能导致得出假阳性或假阴性的检测结果。使用者须了解检测过程中可能存在的潜在错误、准确性的局限性。

4. 试剂盒应低温运输和保存，试剂盒内各试剂使用前，充分融化并振荡均匀后请稍事离心。避免在不必要的情况下反复冻融试剂盒中的试剂。

5. 检测所用 DNA 样本若为组织样本，要确定样本中的组织含有肿瘤细胞组织。若检测样本为福尔马林固定的样本，因其样本中的 DNA 片段易发生降解，故在加样时，可以根据实际情况增加上样量。检测所用 DNA 的质量非常重要，DNA 提取后应进行质控确定提取质量，并应尽快进行试验，如不能马上进行试验，所提 DNA 应立即保存在 $-18^\circ C$ 以下。

6. 本试剂盒所有试剂均经过特别配制，以用于上述检测。随意替换试剂盒中的任何试剂，都可能影响使用效果。不同批号试剂盒成分不可相互混用。

7. 实验请严格分区操作：

第一区：PCR 前准备区——准备扩增所需试剂；

第二区：样本处理区——待测样本和对照品处理；

第三区：检测区——扩增检测。

各区物品均为专用，不得交叉使用，避免污染；实验后即请清洁工作台。在-18℃以下或-70℃以下保存的样品裂解产物，应在加样前置室温解冻，作短暂离心后使用。

实验时注意防止外源 DNA 对试剂的污染，注意先加完样品 DNA 后再进行阳性对照的操作。推荐在制备反应试剂和添加 DNA 模板时，使用单独、专用的移液枪和滤芯枪头。

8. 分装有反应液的反应管应扣盖或装入密室袋内再转移至样本处理区。

9. 反应液分装时应尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄漏污染仪器。

10. 加样时应使样品完全落入反应液中，不应有样品黏附于管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。

11. 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。

12. 实验中所用的离心管、Tip 头必须保证无 RNase 和 DNase。实验中所用过的离心管、Tip 头必须无害化处理。实验中用过的吸头请直接打入盛有 84 消毒液的废物缸内，并与其他废弃物品一同灭菌后丢弃。

13. 工作台及各种实验用品定期用 1%次氯酸钠、75%酒精或紫外灯进行消毒。

14. 所有化学药品都具有潜在的危险性。具有 PCR 实验室上岗证的人员才能使用本试剂盒。在首次使用本试剂盒前，公司技术支持人员对操作者进行培训。操作时，请穿着合适的实验室工作服、并佩戴一次性手套等防护性措施。使用过的试剂盒为临床废弃物，应该妥善处理。

15. 各区域内必备物品一览表（仅供参考）

PCR 前准备区	样本处理区	检测区
1. 离心机	1. 离心机	1. 荧光 PCR 检测仪
2. 混匀器	2. 混匀器	2. 紫外灯
3. 冰箱（4℃、-18℃以下）	3. 冰箱（4℃、-18℃以下）	3. 专用工作服、实验用品、 一次性手套
4. 微量加样器一套	4. 微量加样器一套	
5. 离心管架	5. 离心管架	
6. 消耗品：一次性手套，带 滤芯吸头、	6. 消耗品：一次性手套，带 滤芯吸头，	
7. 紫外灯	7. 紫外灯	
8. 专用工作服和实验用品	8. 专用工作服和实验用品	

[参考文献]

[1] Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, et al. N Engl J Med 2009;360(14):1408-17.

[2] Maughan TS, Adams RA, Smith CG, et al. Lancet 2011;377(9783):2103-14.

[3] Marchetti A, Gasparini G. N Engl J Med 2009;360(8):833-4

[4] NCCN Guidelines Version 2008 Panel Members Colon Cancer.

[基本信息]

注册人/生产企业名称：北京华大吉比爱生物技术有限公司

住所：北京市海淀区永丰屯 538 号 1 号楼 236、237 室

售后服务单位名称：北京华大吉比爱生物技术有限公司

联系方式：

电话：0086-10-80492001

传真：0086-10-80492118

邮编：101300

网址：[http:// www.gbi.com.cn](http://www.gbi.com.cn)

E-mail: gbi-office@genomics.cn

生产地址：北京市顺义区临空经济核心区裕华路 28 号 6 号 4 层，8 号 2 层西侧，12 号 3 层西，12 号 1 层西侧

生产许可证编号：京食药监械生产许 20060069 号

[医疗器械注册证编号/产品技术要求编号]

国械注准 20163400042

[说明书核准日期及修改日期]

核准日期：2016 年 01 月 11 日

修改日期：2017 年 11 月 09 日

修改日期：2021 年 01 月 19 日