

K-ras 基因突变分型检测试剂盒（荧光 PCR 法）

使用说明书

【产品名称】

通用名称：K-ras 基因突变分型检测试剂盒（荧光 PCR 法）

英文名称：K-ras mutation detection Kit （PCR Fluorescence Probing）

【包装规格】

12 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定性检测福尔马林固定、石蜡包埋的肺癌或结直肠癌患者肿瘤组织 DNA 提取物中 K-ras 基因 12、13 密码子的 7 种常见突变，并可鉴别突变类型。

K-ras 癌基因定位于人 12 号染色体，在人类肿瘤发生发展过程中起重要的作用。K-ras 就像一种分子开关：正常时能控制调控细胞生长的路径；发生异常如 K-ras 基因突变时，该基因永久活化，使细胞内信号传导紊乱，导致细胞持续生长，并阻止细胞凋亡从而发生癌变。K-ras 基因突变发生在肿瘤的早期，并且原发灶和转移灶的 K-ras 基因高度保持一致。一般认为，K-ras 基因状态不会因治疗而发生变化。K-ras 基因在多种肿瘤中发生了突变，其发生率在结直肠癌约为 40%，肺癌约为 15%。K-ras 基因突变主要集中在发生在第 2 外显子的 12 和 13 密码子（≥90%），这些突变破坏了 K-ras 蛋白内在的 GTPase 活性，从而使得 K-ras 蛋白处于持续活性状态。

本试剂盒针对 K-ras 基因的 7 种常见突变分型（表 1），包括 12 密码子六种碱基置换突变及第 13 密码子一种碱基置换突变（详见下表），特异性检测突变模板。可用于肿瘤的个体化分子诊断，进而辅助指导肿瘤患者的临床个体化治疗方案。

表1 人类K-ras基因12和13密码子7种主要体细胞突变方式

突变名称	碱基变化	氨基酸变化
13Asp	GGC>GAC	甘氨酸到天门冬氨酸
12Asp	GGT>GAT	甘氨酸到天门冬氨酸
12Val	GGT>GTT	甘氨酸到缬氨酸
12Ala	GGT>GCT	甘氨酸到丙氨酸
12Arg	GGT>CGT	甘氨酸到精氨酸
12Ser	GGT>AGT	甘氨酸到丝氨酸
12Cys	GGT>TGT	甘氨酸到胱氨酸

【检验原理】

本试剂盒以肺癌或结直肠癌患者肿瘤组织中提取的基因组 DNA 作为模板，采用扩增阻滞突变体系结合 Taqman 荧光定量 PCR 技术对样本中 K-ras 基因突变进行分型检测。每个样本的突变检测分 8 管进行，参照管中使用针对 K-ras 基因野生型设计参照引物，7 个突变管中使用针对 K-ras 各突变设计的对应 ARMS 引物，8 管中使用的探针和下游引物相同，探针使用 FAM 荧光标记。内标基因的引物探针位于 jak2 基因，使用 HEX 荧光标记。

【主要组成成份】

K-ras 基因突变分型检测试剂盒（荧光 PCR 法）（12 人份）包括以下组分（表 2）：

表2 K-ras基因突变分型检测试剂盒（荧光PCR法）组成及主要成份

序号	组分名称	成份	数量（12 人份/盒）
1	反应液 0 (ref)	含缓冲液、三磷酸核苷、镁离子、引物和探针等	1 管（300 μL/管）
2	反应液 1(13Asp)	含缓冲液、三磷酸核苷、镁离子、引物和探针等	1 管（300 μL/管）
3	反应液 2（12Asp）	含缓冲液、三磷酸核苷、镁离子、引物和探针等	1 管（300 μL/管）
4	反应液 3（12Val）	含缓冲液、三磷酸核苷、镁离子、引物和探针等	1 管（300 μL/管）
5	反应液 4（12Ala）	含缓冲液、三磷酸核苷、镁离子、引物和探针等	1 管（300 μL/管）
6	反应液 5（12Arg）	含缓冲液、三磷酸核苷、镁离子、引物和探针等	1 管（300 μL/管）

7	反应液 6 (12ser)	含缓冲液、三磷酸核苷、镁离子、引物和探针等	1 管 (300 μ L/管)
8	反应液 7 (12cys)	含缓冲液、三磷酸核苷、镁离子、引物和探针等	1 管 (300 μ L/管)
9	内标	含引物、探针和缓冲液	1 管 (110 μ L/管)
10	DNA 聚合酶	DNA 聚合酶	1 管 (14 μ L/管)
11	阳性质控品	含 K-ras 7 种突变基因及野生基因的合成质粒	1 管 (70 μ L/管)

【储存条件及有效期】

包装后的试剂盒，应避光密闭保存于 -20°C 。有效期为 12 个月。采用泡沫盒加干冰或冰袋密封条件下进行运输，运输过程 6 天内（含 6 天）试剂盒稳定（超过 6 天效果未验证）；不宜在 37°C 条件下放置超过 24 小时；冻融次数 6 次（含 6 次）以下，试剂盒稳定，反复冻融超过 6 次效果未验证。试剂开瓶混合后， 4°C 放置 3 天对检测结果无影响，超过 3 天效果未验证。

【适用仪器】

ABI 7500; Roche LightCycler 480; Stratagene MX 系列 3000P 荧光的实时荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

样本为肺癌或结直肠癌患者肿瘤组织石蜡包埋样本。新鲜采集的样本应立即置于标本箱或湿布包起来带回实验室进行分割固定，并参照《人类疾病石蜡包埋组织收集整理保存技术规范》，对样本进行包括固定-取材-脱水-透明-浸蜡-包埋-切片-烤片等连续步骤的石蜡包埋处理；石蜡包埋病理组织或切片样品应由经验丰富的病理科医生确认含有肿瘤病变细胞，且索取部分应尽量在蜡块中部，尽量剔除非肿瘤组织。样本采集过程中注意无菌操作。样本容器外表贴上带有唯一识别号码的标签。运输和贮存过程中要附有必要的信息，如样本编号、发病日期和样本采集日期。石蜡包埋组织（切片）应存放于 $0-15^{\circ}\text{C}$ ，组织 DNA 提取液可短期存放于 -20°C ，或 -70°C 长期存放；经验证石蜡包埋组织存放 2 年后提取 DNA，使用本试剂盒检测效果无明显变化；石蜡包埋组织 DNA 提取液存放 4 个月，使用本试剂盒检测效果无明显变化。

【检测方法】

1 样本处理及核酸提取

组织样本中肿瘤细胞比例应大于80%。配套使用QIAGEN公司的“石蜡组织DNA提取试剂盒”（Cat NO. 56404）来提取基因组DNA，提取后核酸浓度应不小于 $4\text{ng}/\mu\text{L}$ 。阳性质控品不需要进行核酸提取，阴性质控品（自备纯化水）必需参与核酸提取。

2 扩增试剂准备

从试剂盒中取出PCR反应液0-7、DNA聚合酶及内标，在室温下融化，轻摇混匀，低速离心后向设定的荧光定量PCR反应管或96孔板中分别加入PCR反应液0-7溶液22 μL ，与DNA聚合酶和内标一同转移至样本处理区。96孔板试剂布局可参照图1所示。

图 1：96 孔板试剂及加样布局示意图

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	反应液 0	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5	样本 6	样本 7	样本 8	样本 9	样本 10	阴性质控	阳性质控
B	反应液 1	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5	样本 6	样本 7	样本 8	样本 9	样本 10	阴性质控	阳性质控
C	反应液 2	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5	样本 6	样本 7	样本 8	样本 9	样本 10	阴性质控	阳性质控
D	反应液 3	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5	样本 6	样本 7	样本 8	样本 9	样本 10	阴性质控	阳性质控
E	反应液 4	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5	样本 6	样本 7	样本 8	样本 9	样本 10	阴性质控	阳性质控
F	反应液 5	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5	样本 6	样本 7	样本 8	样本 9	样本 10	阴性质控	阳性质控
G	反应液 6	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5	样本 6	样本 7	样本 8	样本 9	样本 10	阴性质控	阳性质控
H	反应液 7	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5	样本 6	样本 7	样本 8	样本 9	样本 10	阴性质控	阳性质控

3 加样（PCR II 室）

按照下表提示的体积混合样本DNA溶液，作为PCR反应的样本。

DNA溶液	内标	DNA聚合酶	总体积
20	8.4	1	29.4

在装有PCR反应液的PCR反应管或96孔板中分别加入步骤3制备好的样本3.0 μL 。96孔板加样布局可参照图1所示。

4 荧光PCR反应（PCRⅢ室）

将反应管放入荧光PCR检测仪中，循环参数设定如表3：

表3 荧光PCR反应程序

步骤	循环数	温度(℃)	反应时间(min:sec)
1	1	95	10:00
2	40	95	00:05
		62	00:40

荧光信号的收集定为FAM（目的基因）和HEX(或VIC)（内标），数据的采集定在62℃。

【参考值（参考范围）】

对临床试验结果进行分析，通过 ROC 曲线法确定本试剂盒样本突变孔反应液 1（13asp）≤35.6、反应液 2（12asp）≤35.5、反应液 3（12val）≤35.7、反应液 4（12Ala）≤36.2、反应液 5（12Arg）≤36.3、反应液 6（12Ser）≤35.7、反应液 7（12Cys）≤36.1 可判为相应突变阳性。反之则可判为相应突变阴性或者低于本试剂盒的检测下限。

【检验结果的解释】

反应结束后，仪器自动保存结果，分析图像后调节基线（Baseline）的 Start 值、End 值（可自行调节，Start 值可以在 3-10 之间，End 值位于 15-20 之间，调整阴性质控品的扩增曲线使其平直或低于阈值线。在读取 Ct 值时，应首先同时选中样品孔和阴性质控品孔，手动调整阈值线，使其略高于阴性质控品扩增曲线及样本孔基线，再读取数据。

1. Ct 值的确定：用户根据实际情况确定各反应管扩展曲线升起的拐点处，得到其 Ct 值。突变孔 Ct 值是指样本突变检测孔（反应液 1～反应液 7）对应的 Ct 值；参照孔 Ct 值是指样本反应液 0 对应的 Ct 值。一个样本可能同时含有多个突变类型。
2. 除阴性质控品外其他所有反应孔应出现内标曲线，所有样本和质控品的内标应满足 $20 \leq Ct \leq 32$ ，否则提示该孔反应失败，需重新检测，或重新抽提 DNA。阳性质控品目的基因参照孔应满足 $20 \leq Ct \leq 26$ ；阴性质控品（自备纯化水）的突变孔与参照孔均无典型 S 型扩增曲线。
3. 若样本 DNA 模板量偏低（多次测量平均值小于 $5\text{ng}/\mu\text{L}$ ）时建议浓缩后或重新抽提 DNA 再作检测。因本试剂盒不具备浓缩样本功能，故浓缩处理对灵敏度的增加效果未经过验证。
4. 阳性质控品参照孔 $20 \leq Ct \leq 26$ ，提示检测试剂敏感有效，其目的是排除假阴性；阴性质控品的所有孔应不出现典型扩增曲线，提示检测试剂有效，无污染。阳性质控品与阴性质控品需要在同一次实验中同时满足，否则认为 PCR 反应无效，需要重新进行检测。

以上条件需要再同一次试验中同时满足，否则认为 PCR 反应无效，需要重新进行检测。

若试验同时满足上述所述条件，结果判读如下表（表 3）：

表3 结果判读表

反应孔	Ct 值	判定结果	反应孔	Ct 值	判定结果
反应液 1 (13asp)	$Ct \leq 35.6$	突变阳性	反应液 5 (12Arg)	$Ct \leq 36.3$	突变阳性
	$Ct > 35.6$	突变阴性，或低于检测限		$Ct > 36.3$	突变阴性，或低于检测限
反应液 2 (12asp)	$Ct \leq 35.5$	突变阳性	反应液 6 (12Ser)	$Ct \leq 35.7$	突变阳性
	$Ct > 35.5$	突变阴性，或低于检测限		$Ct > 35.7$	突变阴性，或低于检测限
反应液 3 (12val)	$Ct \leq 35.7$	突变阳性	反应液 7 (12Cys)	$Ct \leq 36.1$	突变阳性
	$Ct > 35.7$	突变阴性，或低于检测限		$Ct > 36.1$	突变阴性，或低于检测限
反应液 4 (12Ala)	$Ct \leq 36.2$	突变阳性			
	$Ct > 36.2$	突变阴性，或低于检测限			

【检验方法的局限性】

本试剂盒的检测结果仅供临床参考，不作为治疗或其它临床管理的唯一依据；对患者的临床诊治应结合其症状/体征、病史、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑；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、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；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；不合理的样本采集、转运及处理、以及不当的试验操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果；该检测仅限于规定的样本类型及检测系统（包括适用机型、核酸提取试剂、检测方法等）。

【产品性能指标】

1. 试剂盒应外观整洁，标记清晰，无漏液。试剂融化后，应澄清透明，无混浊及沉淀。
2. 阳性参考品符合率：各突变管检测对应的阳性参考品，均应检出相应突变阳性。
3. 阴性参考品符合率：各突变管检测 12 份阴性参考品，应均为突变阴性；各突变管检测其他各突变管对应的阳性参考品，应均为相应突变阴性。
4. 最低检测限：各突变管检测对应的低于 20ng/μL 总基因组 DNA 时，突变率为 0.2% 的检测限参考品，均应检出相应突变阳性。
5. 重复性：检测 2 份混合阳性参考品，各重复 10 次，参考品相应突变均应检出阳性；每种突变单独进行统计，计算 Ct 值的变异系数 CV 应不高于 5.0%。
6. 除阴性质控品外其他所有反应孔应出现内标曲线，所有参考品和质控品的内标应满足 $20 \leq Ct \leq 32$ ；阳性质控品目的基因参照孔应满足 $20 \leq Ct \leq 26$ ；阴性质控品（自备纯化水）的突变孔与参照孔均无典型 S 型扩增曲线。
7. 批间差：使用三批产品分别检测 2 份混合阳性参考品各 10 次，参考品相应突变均应检出阳性；每种突变单独进行统计，计算 Ct 值的批间变异系数 CV 应不高于 8.0%。
8. 5-氟脲嘧啶（4mg/ml）、奥沙利铂（0.8mg/ml）、阿糖胞苷（0.5mg/ml）三种常用化疗药物的存在对试剂盒检测结果无显著影响。

【注意事项】

1. 实验前请仔细阅读本说明书。
2. 检测所有的样本质量非常重要，提取基因组 DNA 之前必须经过有经验的病理科医生确认所提样本中含有足够比例的肿瘤细胞。
3. 避免反复冻融试剂盒中的试剂。本试剂盒需低温运输，抵达目的地时应处于冷冻状态。
4. 离心管装试剂在使用前应充分融化，混匀，离心数秒，使液体集中在离心管底部。配制反应体系时应注意：所有液体的混匀尽量在漩涡混合器上进行，不用移液器吹打，以免产生气泡，反应体系配制完毕低速离心数秒。试剂盒请在保质期内使用。不同批号的试剂请勿混用。
5. 整个检测过程应分三区进行，一区进行试剂准备；二区进行标本处理、反应体系的配制；三区进行扩增、荧光检测和结果分析。各区的仪器、设备和工作服独立使用，防止污染，造成假阳性。
6. 在操作中，应时刻注意避免外源 DNA 和 DNase 的污染，应使用不含荧光物质的一次性手套（经常替换）、一次性薄壁进口 200 μL PCR 管（或 96 孔 PCR 板加光学贴膜）、移液器头（带滤嘴自卸式），不能用手直接触摸反应管。
7. 实验中的有害有毒标本及试剂应妥善放置，专人保管；废弃物应置专门容器中妥善处理。
8. 实验房间、离心机、扩增仪等仪器设备应定期用 1.0% 次氯酸钠或 70% 乙醇或紫外灯照射消毒。每次实验后用 1.0% 次氯酸钠或 70% 乙醇或紫外灯照射消毒操作台、移液器。

【参考文献】

- [1] Siddiqui AD, Piperdi B. K-ras mutation in colon cancer: a marker of resistance to EGFR-I therapy. *Ann Surg Oncol*. 2010, 17(4):1168-76.
- [2] Lacroix L, Besse B, Bidart JM et al. K-ras status versus EGFR status in lung cancer therapy. *Bull Cancer*. 2009, Suppl:S75-83.
- [3] Ellison, G. Donald, E. & McWalter, G. et al. (2010) A comparison of ARMS and DNA sequencing for mutation analysis in clinical biopsy samples., *J Exp Clin Cancer Res*, 29, 132-18.
- [4] Lang, A. H. Drexel, H. & Geller-Rhomberg, S. et al. (2011) Optimized allele-specific real-time PCR assays for the detection of common mutations in KRAS and BRAF., *J Mol Diagn*, 13, 23-8.
- [5] Kim TH, Park YJ, Lim JA, et al. The association of the BRAF(V600E) mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: A Meta-Analysis. *Cancer*. 2011, 10: 1002-26500.
- [6] Bouchahda M, Karaboué A, Saffroy R et al. Acquired K-ras mutations during progression of colorectal cancer metastases: possible implications for therapy and prognosis. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010, 66(3):605-9.
- [7] Smith D, Bosacki C, Merrouche Y. Use of anti-EGFR antibodies (cetuximab and panitumumab) in the treatment of metastatic colorectal cancer in K-ras wild type patients. *Bull Cancer*. 2009, 96 Suppl:S31-40.
- [8] Kobunai T, Watanabe T, Yamamoto Y et al. The frequency of K-ras mutation detection in human colon carcinoma

is influenced by the sensitivity of assay methodology: a comparison between direct sequencing and real-time PCR. Biochem Biophys Res Commun. 2010, 395(1):158-62.

【生产企业】

企业名称：江苏默乐生物科技有限公司

注册地址：泰州医药高新技术产业园区的 R19 研发楼

生产地址：泰州市药城大道 G02 厂房、R19 楼

电话：0523-82205056

传真：0523-82205058

邮编：225300

【医疗器械生产许可证编号】 苏食药监械生产许 20080073 号

【医疗器械注册证书编号】

【产品标准编号】

【说明书批准及修改日期】