

人 IL-6 基因 174G>C 点突变探针法 qPCR 检测试剂盒

仅

供

科

研

使

用

产品及特点

人 IL-6 基因 (interleukin-6, 白细胞介素 6) 是与炎症相关的细胞因子。它通过调节免疫和炎症

反应,在宿主防御中发挥着重要作用。糖尿病患者存在 IL-6 基因 174G>C 多态性,不同基因型 IL-6 水平不同,IL-6 基因 174G>C 点突变的患者,IL-6 水平明显增高,且差异具有显著性。因此研究人 IL-6 基因 174G>C 点突变具有重要的研究意义,为此本公司开发了专门检测人 IL-6 基因 174G>C 点突变的探针法 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 Cy5 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 IL-6 基因 174G>C 位点设计,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 μL 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	0.5mL	0.5mL 本色管
超纯水	1mL	1.5mL 蓝盖管
人 IL-6 基因 rs1800795 位点检测引物-探针混合液干粉	50 次	0.5 mL 白色管
人 IL-6 基因野生型阳性对照(1E4 拷贝/μL)	250 μL	1.5mL 棕色管
人 IL-6 基因 rs1800795 位点突变型阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	250 μL	0.5mL 黄盖管
使用手册	1 份	无
本产品采用 5 孔盒包装		
注 意: 使用前需要在引物探针干粉管中加入 220 μL 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 μg/μL。
 - 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 10μL	10μL	10μL	10μL	10μL
人 IL-6 基因 rs1800795 位点检测引物-探针混合液	各 4μL	4μL	4μL	4μL	4μL
N 个 DNA 样本	各 3μL				
超纯水	各 3μL	6μL	3μL		3μL
人 IL-6 基因阳性对照(1E4 拷贝/μL)			3μL	3μL	不加
人 IL-6 基因 rs1800795 位点突变型阳性对照(1E4 拷贝/μL)				3μL	3μL

5. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR：

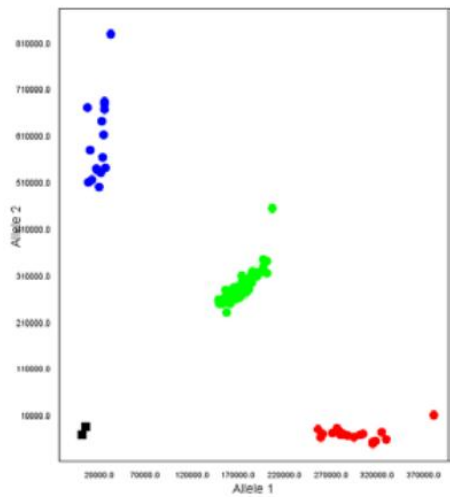
过程	温度	时间
预变性	95℃	90sec
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15sec
	60℃	60 sec (采集 FAM 和 Cy5 通道的荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA)

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 Cy5 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 Cy5 扩增信号，或杂合型 PC 没有 FAM 和 Cy5 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 Cy5 扩增信号，杂合型 PC 有 FAM 和 Cy5 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 Cy5 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 Cy5 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。Cy5 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	Cy5 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

PCR 编号

TW-E10231

说明书	1 份
自备试剂	样品 DNA
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期 1 年

生产企业：上海通蔚实业有限公司

公司地址：上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603

公司电话：021-54845833

技术支持：15800441009