人 IL-6 基因 597G>A 点突变探针法 qPCR 检测试剂盒

目录号：ml107901

使用说明书

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 597G>A 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 597G>A 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 597G>A 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 597G>A 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 rs1800797 位点检测引物-探针混合液干粉	50 次	0.5mL 白色管
人 IL-6 基因野生型阳性对照(1E4 拷贝/μL)	250μL	1.5 mL 棕色管
人 IL-6 基因 rs1800797 位点突变型阳性对照 (1E4 拷贝/μL)	250μL	0.5 mL 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

二、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。

三、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 rs1800797 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	
人 IL-6 基因 rs1800797 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：

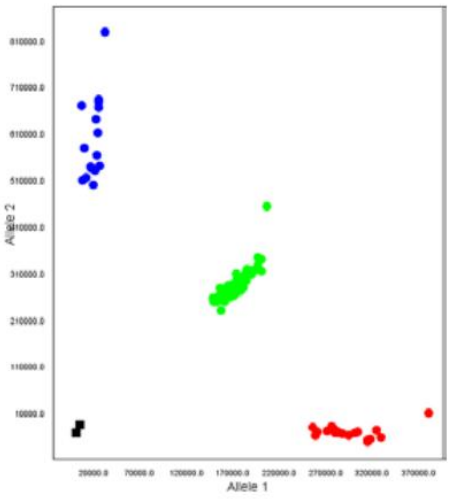
过程	温度	时间
预变性	95℃	90sec
PCR 反应 （45 个循环）	95℃	15sec
	60℃	60 sec（采集 FAM 和 Cy5 通道的荧光信号，淬灭基团均为 TAMRA）

五、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

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