



厦门安提海拉生物科技有限公司
XIAMEN Anti-hela Biological Technology Trade Co. Ltd.

实验报告

1. 实验材料描述

1.1 主要试剂

试剂名称	试剂来源	cat.No
Lysis Buffer for PCR	艾科瑞	AG12306
2 × Taq Master Mix (Dye Plus)	诺唯赞	P112-01

1.2 主要仪器及器材

仪器名称	仪器来源	cat. No.
移液枪	DRAGON	
PCR 仪	ABI	
涡旋混合器	TOPSCIEN	TP903080035
离心机	湘仪	TGL-16K

2. 检测指标:

NCI-H1975 检测 T790M,L858R 位点

3. 实验步骤

1) 设计引物:

引物名称	引物序列 (5'-3')
EGFR-T790M-F	aagccacactgacgtgc
EGFR-T790M-R	tctgcacacaccagttgag
EGFR-L858R-F	tggaggaccgctgcttggtg
EGFR-L858R-R	cccagaatgtctggagagc

- 2) 细胞复苏: 将含有 1 mL 细胞悬液的冻存管在 37°C 水浴中迅速摇晃解冻, 转入 15 ml 离心管中, 加 4 mL 培养基混合均匀。在 1000 rpm 条件下离心 3 min, 弃去上清液, 加 1-2 mL 培养基后吹匀。然后将所有将细胞悬液加入 6 cm 皿中, 加入约 4 mL 完全培养基, 培养过夜。第 2 天换液并检查

细胞密度。待细胞密度达 80%-90%，收集细胞备用。

3) 裂解：细胞沉淀加 100ul Lysis Buffer for PCR，1ul proteinase K 裂解。60℃反应 5 min*3，然后 98℃反应 2 min，放置于冰上，离心备用。

4) 扩增：

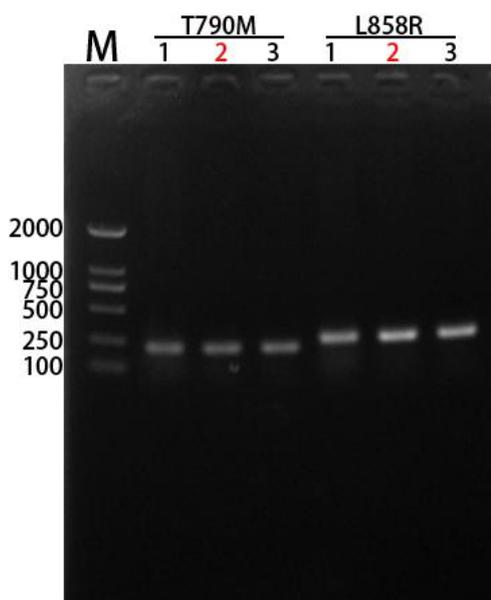
反应体系

2 × Taq Master Mix	25ul
Primer 1 (10um)	2ul
Primer 2 (10um)	2ul
模板(裂解液)	5ul
DDH ₂ O	TO 50ul

反应条件：

95℃	5min	30 cycles
95℃	15s	
55℃	15s	
72℃	60sec/kb	
72℃	5min	

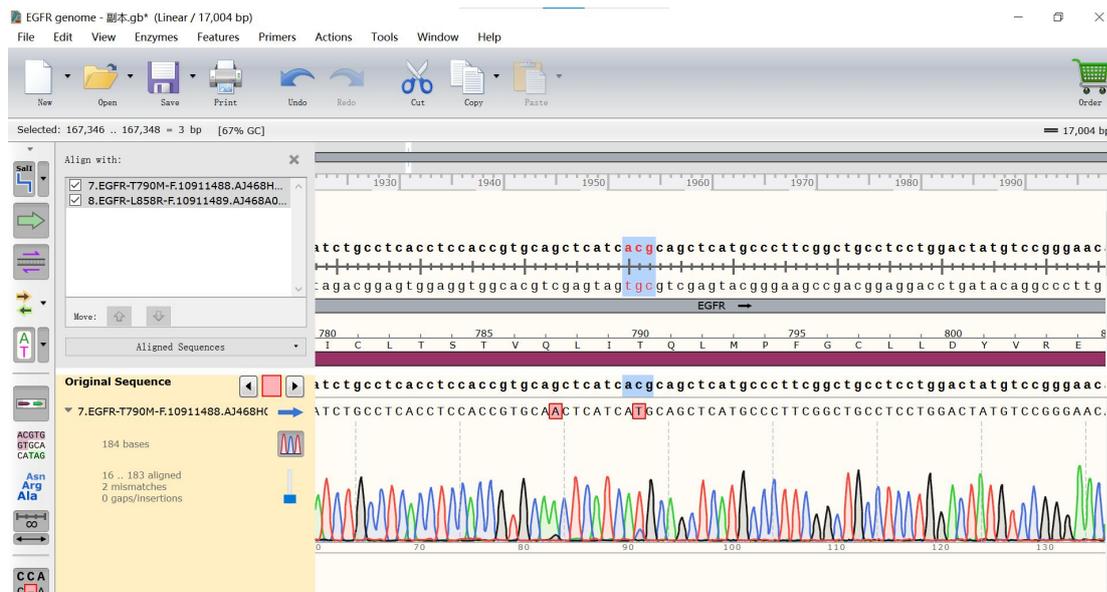
5) 跑胶鉴定：



6) 送测序公司测序：两个位点均送 2 号样品去测序。

4. 测序比对结果：

T790M 测序存在突变，氨基酸从 T(ACG)突变成 M(ATG)
 前面 Q787Q 为同义突变，氨基酸从 Q(CAG)突变成 Q(CAA)



L858R 测序存在突变，氨基酸从 L(CTG)突变成 R(CGG)

