

人 ALDH2 基因多态性检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）

说明书

【产品名称】

通用名称：人 ALDH2 基因多态性检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）

【包装规格】

24 人份/盒、48 人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人全血 ALDH2 基因的 c.1510 G>A 位点多态性，本产品检测结果仅供临床参考，不应作为患者是否用药的唯一依据，临床医生应结合患者病情、疗效及其他实验室检测指标等对本产品的检测结果进行综合判断。

乙醛脱氢酶 2（ALDH2）基因位于人类第 12 号染色体，编码乙醛脱氢酶和硝酸酯酶两种异构酶，参与乙醇、硝酸酯等的代谢。ALDH2 基因存在遗传多态性，其中与亚洲人群最为密切的是 c.1510 G>A（Glu504Lys）位点。野生型为 G 等位基因(ALDH2*1)，突变为 A 等位基因(ALDH2*2)，携带率为 30%~50%。

携带 ALDH2*2 突变基因的个体，编码的蛋白质 504 位谷氨酸被赖氨酸所取代，导致 ALDH2 酶活性下降，杂合子个体的酶活性仅为野生型个体的 10%，而突变纯合子个体酶活性缺失。因此，携带 ALDH2*2 突变基因的个体酒精代谢能力下降，少量饮酒即出现脸红、心跳加速等不适。

硝酸酯类如硝酸甘油、硝酸异山梨酯、单硝酸异山梨酯是治疗心绞痛的一线药物，其共同的药理机制在于通过释放一氧化氮来激活体内的鸟苷酸环化酯和体内钙离子浓度，达到扩张静脉、动脉及冠状动脉血管，减轻心脏负担，降低心肌耗氧量，发挥抗心绞痛的作用。但其临床有效性却往往因人而异，研究表明，ALDH2 是硝酸酯类药物的有效代谢物一氧化氮形成的关键，如果病人基因中携带有 ALDH2*2 突变基因，那么 ALDH2 编码的硝酸脂酶活性会降低 10 倍以上，使该类药物无法产生一氧化氮，以致难以发挥药效。因此，通过检测人 ALDH2 基因多态性可指导硝酸甘油等硝酸酯类的合理用药，一旦患者携带 ALDH2*2 突变基因应尽可能改用其他急救药物，避免硝酸甘油含服无效。

相关的临床或实验室诊断方法：

传统的基因多态性检测方法有 PCR-基因芯片杂交法、Sanger 测序法和 qPCR 法等。

【检验原理】

本产品采用多重 PCR 结合荧光探针熔解曲线技术，利用荧光标记的探针对人抗凝外周全血样本进行扩增的检测。

多重 PCR：根据 NCBI 上公布的 ALDH2 基因信息，选择人群中常见的人 ALDH2 c.1510 G>A 位点作为检测位点，根据此位点所在区域的基因序列特点，设计高度特异的引物探针进行多重 PCR 检测。同时以人类基因组 DNA 上的β-actin 基因做内控（Internal Control，IC），监测实验有效性。

荧光探针熔解曲线技术：利用荧光探针与靶标序列杂交形成杂交链熔解温度（Tm）

不同来判读靶点的基因型。

此外，本产品建立了 UNG 酶防污染体系，PCR 反应液中以 dUTP 取代 dTTP，UNG 酶的作用原理是选择性水解断裂含有 dU 的双链或单链 DNA 中的尿嘧啶糖苷键，消除 PCR 产物污染，从而达到 PCR 防污染的作用。UNG 酶的最佳活性温度为 50℃，95℃ 可被灭活。

本产品可检测的位点多态性信息如下表：

基因	位点	检测通道
ALDH2	c.1510 G/G	FAM
	c.1510 G/A	
	c.1510 A/A	
β-actin	-	ROX

【主要组成成分】

组成	24 人份		48 人份		主要成分
	规格	数量	规格	数量	
反应液 I	578.5μL	1 管	1157μL	1 管	引物、探针、dN(U)TP、PCR 缓冲液、UNG 酶
反应液 II	19.5μL	1 管	39μL	1 管	DNA 聚合酶
R 质控品	20μL	1 管	20μL	1 管	ALDH2 c.1510 G/A、β-actin 质粒 DNA 混合液
空白对照	300μL	1 管	300μL	1 管	纯化水
样本处理液	6mL	1 管	6mL	2 管	NaOH、纯化水

说明：不同批号试剂盒中各组分不可以互换使用。

【储存条件及有效期】

试剂盒置于-30℃~-15℃避光保存，有效期为 12 个月。

试剂盒开瓶后-30℃~-15℃避光保存，效期内性能稳定。

试剂盒在 37℃可避光保存 5 天。

试剂盒可反复冻融 10 次。

试剂盒在箱内温度不超过 25℃的条件下，可运输 7 天。

生产批号、生产日期、使用期限见标签。

【适用仪器】

Bio-Rad CFX96、SLAN-96/P/S 实时荧光定量 PCR 仪

【样本要求】

适用样本

抗凝全血样本：对人外周抗凝全血样本的检测，所用抗凝剂为乙二胺四乙酸（Ethylenediaminetetraacetic acid，EDTA)或枸橼酸钠，不能使用肝素（20 IU/mL）抗凝。

采样方法

抗凝全血样本：抽取静脉血不少于 0.4mL，放入含有抗凝剂的管中，标记好样本的姓名和编号等样本信息。

样本保存

抗凝全血在室温放置可保存 24 小时，2~8℃可保存 1 个月，-18℃以下可保存 5 年，冷冻保存时应避免反复冻融。

样本运输

抗凝全血运输时需用泡沫箱加冰袋密封，且在途不宜超过 72 小时。

【检验方法】

样本处理

从试剂盒中取出样本处理液置于室温融化并震荡混匀备用，将待检抗凝全血样本充分颠倒混匀后取出 5μL，加入 200μL 样本处理液，震荡混匀，短暂离心 3~5 秒，做好标识。

反应液准备

从试剂盒中取出其余组分置于室温融化并震荡混匀，短暂离心 5~10 秒。根据该次实验的检测需求计算各组分的用量，反应液需求量=待检样本数+1 个 R 质控品+1 个空白对照。

每人份反应体系的配制如下表所示：

组分	反应液 I（μL/人份）	反应液 II（μL/人份）	总量（μL/人份）
反应体系	22.25	0.75	23

配制完成后，振荡混匀，离心 10~20 秒，按 23μL/人份将反应液分装到 8 联管或 96 孔 PCR 板中，做好标识。

加样（注意避免交叉污染）

分别吸取处理后待检样本、R 质控品以及空白对照各 2μL，依次加到各反应孔中，盖紧管盖，做好标识，短暂离心 5~10 秒。

PCR 扩增

将上述已加模板的反应管置于荧光 PCR 仪中，并记录好样本摆放顺序，按下表设置 PCR 扩增参数。

序号	步骤	温度	时间	循环数
1	UNG 酶反应	50℃	2 min	1
2	预变性	95℃	5 min	1
3	变性	95℃	15 sec	40
4	退火、延伸	62℃	30 sec	
5	熔解程序	95℃	2 min	1
		48℃	4 min	1
		48~76℃	收集荧光	1
检测通道: FAM、ROX				

结果分析

按照分析软件生成的熔解曲线图像，根据各个信号通道上的特定 Tm 值范围内有无熔解峰来鉴定样本的基因型别。由于仪器软件只能自动读取高于阈值线的熔解峰的 Tm 值，因此，当软件无法自动给出 Tm 值时，可通过适当调节阈值或者人工判读的方式获得 Tm 值。

【阳性判断值】

空白对照：FAM、ROX 通道均为阴性。

R 质控品：本质控品采用混合质粒样本作为阳性对照来监控实验的有效性，包含本试剂盒所检测的 c.1510 G>A 位点为杂合突变型的质粒以及内参基因β-actin 质粒。

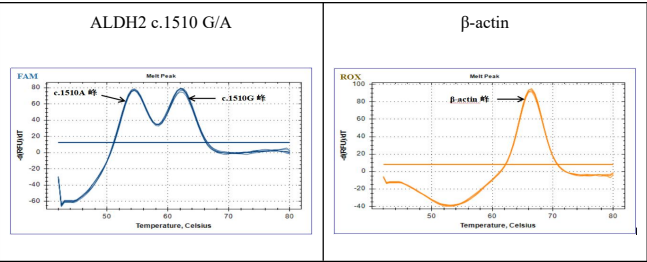
FAM 和 ROX 通道应均为阳性，且熔解峰 Tm 值应均在参考范围之内，满足以上条件，表明本次实验成功有效，可对待样本进行分析。

待检的人全血样本检测结果：FAM 和 ROX 通道应均为阳性，且熔解峰 Tm 值应均在参考范围之内，其中 FAM 通道检测 c.1510 G>A 位点，ROX 通道检测内参基因 β -actin。任意通道出现无熔解峰或熔解峰 Tm 值不在参考范围之内，说明该检测结果无效，建议重新检测。

表 1 各位点多态性对应通道 Tm 值参考范围

基因	位点	Tm 值参考范围	信号通道
ALDH2	c.1510 G/G	60.27~64.95℃	FAM
	c.1510 G/A	60.27~64.95℃ 52.85~57.36℃	
	c.1510 A/A	52.85~57.36℃	
β -actin	-	65.23~68.58℃	ROX

图 1 典型样本检测结果示意图



【检验结果的解释】

本试剂盒一孔反应液即可对 ALDH2 基因进行多态性分析，在设计上，作为内控（IC）的 β -actin 基因单独使用 ROX 通道，因此每个样本的 FAM 和 ROX 通道必须都为阳性。

【检验方法的局限性】

- 1.本试剂盒只检测人群中常见的 ALDH2 c.1510 G>A 位点，其他位点类型在本试剂盒检测范围之外无法检出。
- 2.本试剂盒内的引物和探针所覆盖区域可能存在其他未知单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism, SNP），从而影响引物和探针的结合效率导致无法检出。
- 3.全血样本含有大量的 PCR 抑制物及有色物质，直接使用可能会导致检测信号偏低或者漏检，须使用本试剂盒中配套的样本处理液进行预处理。

【产品性能指标】

准确性

采用 3 批产品对准确性进行研究，结果显示 ALDH2 c.1510 G>A 位点的所有基因型本试剂盒均能准确检出。

最低检测限

对白细胞计数 $\geq 0.5 \times 10^9/L$ 的全血样本或浓度 $\geq 0.5ng/\mu L$ 的 DNA 样本均能准确检出。

分析特异性

本试剂盒对不受血液中常见内源物质（甘油三酯 $\leq 11.47mmol/L$ 、总胆固醇 $\leq 14.66mmol/L$ 、总胆红素 $\leq 356.73\mu mol/L$ 、血红蛋白 $\leq 10g/L$ ）和外源药物（硝酸甘油 $\leq 1.5mg/d$ ）的干扰；对常用的抗凝剂（EDTA $\leq 7.2mg/L$ 、枸橼酸钠 $\leq 109mmol/L$ ）无抑制反应；对结构类似物（如：大肠杆菌 DNA、同源基因）均无交叉反应。

精密度

使用本试剂盒对检测范围内的所有基因型样本重复检测 10 次，重复结果一致且所有基因型均能准确检出。

【注意事项】

- 1.试剂盒必须严格按照所要求的保存条件保存，各组分使用前请充分融化、混匀并离心后再开盖使用，以保证反应体系体积完整及防止潜在的污染。
- 2.请严格分区操作实验，各区物品均为专用，实验室环境污染、试剂污染、样本交叉污染可能导致假阳性结果；试剂运输、保存不当或试剂配制不准确可能会引起试剂检测效能下降、出现假阴性或检测不准确的结果。
- 3.本试剂盒适用样本为 EDTA 或枸橼酸钠抗凝的外周全血，若使用其他类型的样本，出现检测结果差异与本试剂盒质量无关。
- 4.每次实验应进行质量控制。
- 5.检测样本应视为具有传染性物质，操作和处理均需符合相关法规要求。
- 6.实验中使用的吸头请直接打入盛有消毒剂的废液缸内，并与其他废弃物一同灭菌后方可丢弃。

【参考文献】

[1] 罗云杰,成守金.人 ALDH2 基因多态性研究[J].检验医学与临床 2020,17(18) : 2729- 2732.

[2] 邱礼佳,林贞葵,陈慧怡,李金花,林梦琴,梁少明,刘伟,郑恒.乙醛脱氢酶 2(ALDH2) 基因多态性与酒精相关疾病的研究进展[J].实验与检验医学,2020,38(04):611-613+617.3.

[3] 王慧,罗娥,欧雅文.广东地区汉族人群乙醛脱氢酶 2 基因 Glu504Lys 多态性的研究[J].检验医学与临床,2018,15(21):3197-3199+3202.

[4] 李凯咪,邓炯.乙醛脱氢酶 2 型与乙醛在肿瘤发生发展中的作用[J].中国肿瘤,2019, 28(01) : 39-45.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：深圳会众生物技术有限公司
住所：深圳市宝安区新安街道兴东社区丰业源工业厂区厂房 B1 夏谷 101
联系方式：
售后服务单位名称：
联系方式：
生产地址：深圳市宝安区新安街道兴东社区丰业源工业厂区厂房 B1夏谷101、西乡街道宝安大道洪盛工业园三号厂房301
生产许可证编号：
【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】
【说明书核准及修改日期】