

ALDH2 基因检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】

ALDH2 基因检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

24 人份/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测全血样本中 ALDH2 基因 1510 G>A 多态性。

人 ALDH2 基因具有遗传多样性。中国人群中，ALDH2 基因最常见的多态性位点为 G1510A，又称 ALDH2*2；携带 ALDH2*2 突变等位基因的个体酶活性大幅下降，杂合子个体酶活性仅为野生型个体的 10%，突变纯合子个体酶活性缺失。

ALDH2 基因编码的线粒体乙醛脱氢酶是抗心绞痛急性发作药物硝酸甘油的重要代谢酶，可将硝酸甘油代谢为具有药理活性的一氧化氮，ALDH2 基因与硝酸甘油代谢有关联性。研究表明，携带 ALDH2*2 等位基因的个体代谢硝酸甘油的能力下降，硝酸甘油抗心肌缺血的效应减弱。

【检测原理】

Taqman-ARMS 探针技术基于实时荧光定量 PCR 平台，结合 ARMS 特异性富集和 Taqman 探针特异性荧光检测两种技术对基因多态性进行检测。本产品选取人类基因组中 ALDH2 基因序列，分别在 ALDH2 1510 SNP 位点上下游设计 ARMS 引物及探针进行 PCR 扩增，利用 ARMS 引物对靶基因序列进行特异性 PCR 扩增，Taqman 探针针对扩增产物进行特异性检测，通过监测整个 PCR 过程荧光信号的变化，对待测模板进行定性分析。

PCR 检测使用尿苷酶(UDG)防污染体系，经加热可以选择性地降解 U-DNA，以防止先前 PCR 扩增产物的污染。

同时本产品采用内标质控体系，用于监测反应体系可能存在的抑制因素。内标模板与靶基因无同源性，内标探针选择的是与靶基因探针通道（FAM 通道）无冲突的另一检测通道（HEX/VIC 通道）。

【主要组成成分】

表 1 试剂盒主要组成成分

序号	产品组成	主要成分	规格及装量
1	ALDH2 PCR 反应液 P	Taq 酶、UDG 酶、dNTP、Mg ²⁺	600μL×1 管
2	ALDH2 引物探针混合液 G	引物、探针	204μL×1 管
3	ALDH2 引物探针混合液 A	引物、探针	204μL×1 管
4	ALDH2 阳性质控品 1	ALDH2 GG 型灭活标本 DNA	40μL×1 管
5	ALDH2 阳性质控品 2	ALDH2 GA 型灭活标本 DNA	40μL×1 管
6	ALDH2 阳性质控品 3	ALDH2 AA 型质粒、内标质粒	40μL×1 管
7	ALDH2 内标质控品	内标质粒	80μL×1 管
8	ALDH2 阴性质控品	纯水	800μL×1 管

注 1：不同批次之间同一组分不可以相互替换。

注 2：试剂盒以外必需的设备及耗材：荧光定量 PCR 仪、干式恒温仪、涡旋混合器、生物安全柜、移液器及吸头、离心管、高速离心机、微型离心机、PCR 反应管、无粉乳胶手套、一次性口罩、天根生化科技（北京）有限公司核酸提取或纯化试剂（体外诊断试剂备案号：京海械备 20150135）。

【储存条件及有效期】

-20℃ ±5℃ 避光保存；效期为 6 个月，产品效期详见外包装。

开瓶后冻融次数及稳定性要求：开瓶后稳定保存不超过 3 个月，反复

冻融次数不超过 3 次。

【适用仪器】

适用于 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪、Bio-Rad CFX-96 型荧光定量 PCR 仪、罗氏 Cobas z480 型荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

1. 检测样本类型：抗凝全血标本。
2. 样本采集：抽取静脉血 2～5mL，置于 EDTA 抗凝管(紫盖)内，轻轻颠倒混匀。
3. 样本保存：在 2～8℃ 条件下保存不超过一周，-20℃ ±5℃ 条件下保存不超过 6 个月。
4. 提取后样本 DNA 保存：-20℃ ±5℃ 条件下保存不超过 6 个月。
5. 运输：密封冷冻运输，避免解冻和漏液。

【检验方法】

1. 样本处理

1.1 样本处理和核酸提取

本试剂盒不包含核酸提取成分，样本、阴性质控品处理采用商品化的核酸提取试剂盒，其中阴性质控品（180μL）提取时需要加入内标质控品（20μL），使用天根生化科技（北京）有限公司核酸提取或纯化试剂（体外诊断试剂备案号：京海械备 20150135），具体操作参见该试剂盒说明书，但要注意以下事项。

- 1）提取 DNA 需要测定浓度，并满足 OD260/OD280=1.6～2.0；
- 2）推荐 DNA 上样量 40～120ng；
- 3）提取完的 DNA 建议立即进行检测，否则请于-20℃ ±5℃ 保存。

1.2 准备

实验开始前取出试剂盒内阴性质控品及内标质控品，充分解冻并持续振荡 15s 混匀，瞬时离心 30s，准备相应数量的 PCR 反应管，除样本外还应包括 1 个阴性质控品及 3 个阳性质控品反应管。

2. PCR 试剂配制及加样

检测反应设置阴性质控和阳性质控。

2.1 提前 30min 将于冷冻保存的试剂取出，室温解冻，使用前振荡 15s，瞬时离心 10s。

2.2 确定反应数 N，N=待检样本数(n)+阳性质控品数(3)+阴性质控品数（1）+1。计算如下表：

表 2 体系配制

试剂	引物探针混合液（μL）	PCR 反应液（μL）
A	ALDH2 引物探针混合液 G 8.5×N	ALDH2 PCR 反应液 P 12.5×N
B	ALDH2 引物探针混合液 A 8.5×N	ALDH2 PCR 反应液 P 12.5×N

2.3 取离心管配制反应体系，试剂全部加入后振荡 15s，瞬时离心 10s。

2.4 将上述混合液 21μL/管分装至 PCR 反应管中备用。

2.5 加样：分别取阳性质控品、提取后阴性质控品和待测样本的 DNA 提取液各 4μL 分别加入对应的 PCR 反应管中，盖紧管盖，瞬时离心 15s 将管壁上的液体全部甩至管底，如有气泡，轻弹、离心直至气泡去除，然后立即进行 PCR 反应。推荐样本摆放位置，如下表 3：

表 3 推荐样本摆放位置

名称	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ALDH2(G)	①	②	③	④	⑤	⑥	STD1	STD2	STD3	NTC
ALDH2(A)	①	②	③	④	⑤	⑥	STD1	STD2	STD3	NTC

注：①-⑥代表样本，STD1-3 分别代表 ALDH2 阳性质控品 1-3，NTC 代表

阴性质控品。

3. PCR 扩增程序设置

3.1 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪(Version 2.3)

- 1) 面板设置：双击“7500 System Software”图标打开软件，单击“Advanced Setup”，进入“Experiment Properties”界面，对实验进行命名。选择机型为 7500（96 Wells），选择实验类型为“Quantitation-Standard Curve”，选择荧光收集方式为“TaqMan® Reagents”。选择反应时长，单击“Plate Setup”进入“Define Targets and Samples”编辑界面：在“Define Targets”对话框内，根据需要单击“Add New Target”可添加多个 Targets，在“Target name”中输入相应的编号名称，将“Reporter”改为“FAM”及“VIC”，将“Quencher”改为“None”；在“Define Samples”对话框内，根据需要单击“Add New Sample”可添加多个 Samples，在“Sample name”中输入相应编号名称。单击打开“Assign Targets and Samples”编辑界面：在“View Plate Layout”界面选中样本所放的孔位，确认与仪器相对应；在“Assign Target（s）to the selected wells”对话框中，将对应的 Target 划“√”；在“Assign Sample（s）to the selected wells”对话框中，将对应的 Sample 划“√”；在“Select the dye to use as the passive reference”对话框界面中选择“(none)”。
- 2) 反应条件设置：单击“Run Method”进入反应条件设置面板，编辑所用扩增程序(见表 3)，并在“Reaction Volume Per Well”内输入“25”；单击“Add Stage”可以选择“Holding”或者“Cycling”，其中“Holding”为添加一个温度步骤，“Cycling”为添加一个可循环的若干温度步骤；单击“Add Step”可以选择“Before”或者“After”，即可在一个 Stage 的前或后添加一个 step；在“Number of Cycles”可以更改为相应的循环数。确认无误后，点击“Start”后将结果保存，即可开始扩增检测。

3.2 Bio-Rad CFX-96 型荧光定量 PCR 仪

- 1) 面板设置：双击“Bio-Rad CFX Manager”图标打开软件，单击“Prime PCR”，选择“Probe”进入设置界面：单击“Plate”下的“Create New”进入面板编辑，单击“Scan Made”下拉框选择“All Channels”，单击“Select Fluorophores”下拉框勾选“FAM”，在“Sample Type”下拉框选择所选反应孔的检测样本类型，包括“Unknown”（待测样本），“Positive Control”（阳性对照），“Negative Control”（阴性对照），选中反应孔在“FAM”处打勾，根据实验需要可在“Target Name”中输入扩增基因名称，在“Sample Name”输入所选检测孔的样品名，并打勾确认。设置结束后点击“OK”。
- 2) 反应条件设置：单击“Protocol”下的“Create New”进入设置界面，需编辑反应体系及扩增程序（见表 3），在图形或文本模式下可以直接对温度和保持时间进行编辑。单击“Insert Step”在程序中增加一个温度步骤，单击“Delete Step”在程序中删除选中步骤，单击 Add Plate Read To Step，在程序中指定获取荧光数据的时间。点击“GOTO”步骤的重复次数，改变程序中的循环次数，点击“GOTO”步骤数可改变 GOTO 循环中所包含的步骤。设置完成后，单击“Start Run”后，选择文件保存的位置并编辑文件名后，即可进行扩增检测。

3.3 罗氏 Cobas z480 型荧光定量 PCR 仪

- 1) 面板设置：在“User Defined Workflow”操作系统，双击“LightCycler® 480 SW UDF 2.0.0”图标打开软件，输入用户名和密码登录后进入软件主界面，点击“New Experiment”进入程序设定界面。点击“Experiment”，在“Detection Format”下拉菜单选择“Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe”。点击“Sample Editor”，在 Step1 中选择“Abs Quant”（绝对定量）；

在 Step2 中选择对应的样本反应孔，在右侧编辑栏中分别对每个反应孔进行编辑：在“Sample Name”编辑样本名称，“Quantification Sample Type”选择样本类型“Unknown”（待测样本），“Positive Control/Calibrator”（阳性对照）、“Negative Control”（阴性对照）。

2）反应条件设置：点击“Experiment”，在“Reaction Volume”输入反应体系大小。按照所需 PCR 反应条件进行编辑（见表 3）：在“Program Name”添加反应步骤，并选择“Cycles”（循环数）和“Analysis Mode”；单击每个“Program”对各步骤的反应温度及时间进行编辑。在荧光信号采集阶段，Analysis Mode 下拉菜单中选择 Quantification，Acquisition Mode 下拉菜单中选择 Single。设置完成后，单击“Start Run”选择保存位置并编辑文件名称，即可进行扩增检测。

表 4 PCR 扩增程序

序号	阶段	温度	时间	循环数
1	UDG 酶反应	37℃	2min	1
2	预变性	95℃	3min	1
3	变性	94℃	15s	10
4	退火	62℃	20s	
5	延伸	72℃	30s	
6	变性	94℃	15s	30
7	退火	60℃	20s	
8	延伸，荧光信号采集（FAM，VIC/HEX）	72℃	30s	
9	仪器冷却	25℃	1min	1

4. PCR 结果分析条件设定

反应结束后，使用 PCR 仪配套软件对本次试验结果进行分析，其基线（噪音线）及阈值线为自动设置。当发生背景信号过高等情况而使得扩增曲线水平部分出现异常时，请手动设置基线；另外，因为不同的基因扩增出的信号大小和指数期的位置会有所不同，当阈值线位置不当而导致结果分析有误时，请手动设置阈值线，以下为手动设置基线及阈值线的方法。

4.1 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪

基线设置：点击 Analysis settings 选择基线设置不正确的反应孔，取消“Auto Threshold”和“Auto Baseline”选项，设置 “Start /End Cycle” 为扩增信号出现的前一个循环点击“Analysis。”

阈值线设置：点击 Analysis settings 选择基线设置不正确的基因，取消“Auto Threshold”设置 “threshold” 数值点击“Analysis”

4.2 Bio-Rad CFX-96 型荧光定量 PCR 仪

基线设置：在“定量”选项卡的荧光基团选择器中选择一个荧光基团，方法是单击扩增图表下方荧光基团名称旁边的框，选择设置基线阈值以打开“基线阈值”窗口，调整每个反应孔的开始和结束基线循环，在“基线循环”窗格中，通过单击行号选择一个或多个反应孔，单击左上角可选择全部反应孔，按住 Ctrl 键可选择多个单独的反应孔，而按住 Shift 键则可选择多个连续的反应孔，为所有选定的反应孔调整基线起点循环和基线终点循环，或在电子表格底部更改开始和结束循环数，单击确定。

阈值设置：单击扩增图表中的阈值线，然后垂直移动鼠标指针即可。

4.3 罗氏 Cobas z480 型荧光定量 PCR 仪

基线设置：点击 Analysis，在 create new analysis 中选择 Abs Quant/Fit Points，在弹出框中点击√，选择 Noise Band 窗口，在 Noiseband(Auto)下拉菜单中选择 noiseband (Fluoresc) 选项，单击扩增图表中的噪音线（基线），

然后垂直移动鼠标指针即可。

阈值设置：在 Noise Band 窗口，选择 Analysis 窗口，单击 Threshold(Auto)，然后垂直移动鼠标指针即可调整阈值线。

5. 质量控制

- 5.1 内标：所有反应孔内标通道均应出现 S 型曲线，且 Ct 值≤25；
 - 5.2 阴性质控品：靶基因通道无 S 型扩增曲线，或在报告界面无 Ct 值显示，或两个扩增反应 Ct 值均>25；内标通道有 S 型曲线，且 Ct 值≤25；
 - 5.3 ALDH2 阳性质控品 1：靶基因通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值<25；ALDH2(A) Ct 值-ALDH2(G) Ct 值≥5；
 - 5.4 ALDH2 阳性质控品 2：靶基因通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值<25；|A-LDH2(G) Ct 值-ALDH2(A) Ct 值|<3；
 - 5.5 ALDH2 阳性质控品 3：靶基因通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值<25；ALDH2(G) Ct 值-ALDH2(A) Ct 值≥5；
- 以上条件必须在同一次实验中全部满足，否则本次实验结果无效。

【检测结果的解释】

结果分析判读：

- 1. 每个样本内标通道 Ct 值应≤25，且靶基因通道两个扩增反应中至少其中一个 Ct 值<25（靶基因通道无扩增曲线，Ct 值按 30 计算），满足此条件后按下表判读：

表 5 ALDH2(G/A)结果判读

检测名称	Ct 值	结果	判断
ALDH2 (G)	Ct=A	B-A≥5	GG 基因型
ALDH2 (A)	Ct=B	B-A <3	GA 基因型
		A-B≥5	AA 基因型

- 2. 若样本内标通道 Ct 值>25，则检测无效，建议重新提取样本。
 - 3. 若样品内标通道 Ct 值≤25，且靶基因通道 3≤|B-A|<5，则检测无效，建议测序。
- 【检验方法的局限性】
- 1. 本检测结果仅供临床参考。
 - 2. 当样本 DNA 浓度低于试剂盒的最低检测限时，可能无法准确检出。
 - 3. 扩增产物的污染和核酸提取中标本间的交叉污染，会导致不确定结果。因此，PCR 临床实验室需要有严格的实验室分区、实验室管理和质量控制措施。
 - 4. 不合理的样本采集、转运及处理有可能影响实验结果。
 - 5. 请严格按照本说明书要求进行试剂操作及存储，错误的操作及试剂盒储存条件的改变均可能导致结果的不准确。
 - 6. 本试剂盒仅限于检测 ALDH2（G/A）的基因多态性，其它多态性不在本试剂盒检测范围内。

【产品性能指标】

- 1. 最低检测限：10ng 样本能准确检测出对应基因型。
- 2. 特异性：使用试剂盒检测 ALDH2 阴性参考品，检测结果均为阴性。
- 3. 准确性：使用试剂盒检测 ALDH2 阳性参考品，检测结果均为对应型别。
- 4. 精密度：同一批试剂重复检测精密度参考品 10 次，检测结果均为对应型别，且检测结果 Ct 值变异系数 CV 值≤5%。
- 5. 干扰物质：高浓度血红蛋白（≤200g/L）、高浓度甘油三酯（≤37mmol/L）、高浓度胆红素（≤342umol/L）和高浓度硝酸甘油（6ng/mL）对 PCR 结果无明显干扰。

【注意事项】

- 1. 本产品仅用于体外诊断。
- 2. 本试剂盒中的阴性质控品为纯水，阳性质控品均为灭活的样本提取后核酸，均无传染性，但操作时应仍视为传染性物质进行处理。
- 3. 开始检测前请仔细阅读本说明书，操作人员应经过专业培训，具有合格的操作技能，并严格按照说明书要求进行操作。
- 4. 样本操作和处理、实验后的废弃物品，如吸头、扩增产物的处理需符合相关法规要求；卫生部《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》等。
- 5. 使用本产品时，应遵循临床基因扩增实验室的技术规范进行操作。实验过程应分区进行（试剂准备区、样本制备区、扩增和产物分析区）各区的仪器、耗材、试剂等独立专用，不得交叉使用，各区间人员流动及空气流动应有严格要求，最大限度避免交叉污染。
- 6. 为了保护操作者和避免环境污染，样本处理应在生物安全柜内进行操作。
- 7. 实验用的消耗品（如离心管、吸头等）应保证无核酸酶及其他污染。
- 8. PCR 仪应定期校准及维护，以保证实验结果的可靠性。

【参考文献】

- [1] 任帅, 李异玲. 乙醛脱氢酶 2 基因多态性与酒精性肝病的相关性研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2017, 26(1): 86-89.
- [2] 罗怀容, 张亚平. 乙醛脱氧酶 2 (ALDH2) 基因研究进展及其与饮酒行为的关系[J]. 遗传, 2004, 26(2): 263-266.
- [3] Peng L M, Chen X P, Sun J, et al. Influence of ALDH2 Glu504Lys polymorphism on nitroglycerin response in chronic heart failure and involvement of Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP)[J]. International journal of clinical pharmacology and therapeutics, 2012, 50(10): 701-711.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：北京旌准医疗科技有限公司
住 所：北京市北京经济技术开发区经海四路 156 号院 14 号楼 4 层
联系方式：
电话号码：010-56380023
传真号码：010-56380029
售后服务单位名称：北京旌准医疗科技有限公司
联系方式：
电话号码：010-56380023
传真号码：010-56380029
生产地址：北京市北京经济技术开发区经海四路 156 号院 14 号楼 4 层、11 号楼 4 层
生产许可证编号：京食药监械生产许 20200028 号
【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】
国械注准 20203400089
【说明书核准日期及修改日期】
2020 年 01 月 22 日