

人 *ALDH2* 基因多态性检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 说明书

【产品名称】

通用名称：人 *ALDH2* 基因多态性检测试剂盒 (PCR-荧光探针法)

【包装规格】

12 测试/盒、24 测试/盒、48 测试/盒。

【预期用途】

试剂盒用于体外检测人外周血基因组 DNA 中 *ALDH2* 基因 G1510A 多态性位点。

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^[1,2]。*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^[3]。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^[4]。国家卫生计生委医政医管局印发的《药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南（试行）》中指出：携带 *ALDH2**2 等位基因的心绞痛患者应尽可能改用其他急救药物，避免硝酸甘油含服无效^[5]。试剂盒通过检测人 *ALDH2* 基因 G1510A 位点，为临床提供硝酸甘油用药参考。

【检验原理】

试剂盒采用PCR-荧光探针技术，在一个反应体系内检测人*ALDH2*基因G1510A多态性位点，体系包含位点特异的一对扩增引物及两条不同标记的荧光探针（两条探针对应两个等位基因）。体系中加入模板DNA后开始PCR扩增反应，反应时仪器实时采集记录荧光探针经酶切后释放的荧光信号强度，反应结束后通过分析各检测通道的阈值循环数（Ct值）进行基因型判定。同时，试剂盒采用了UNG-dUTP防污染设计，可有效防止扩增产物污染导致的假阳性。

【主要组成成分】

试剂盒组分	主要组成成分	12 测试/盒	24 测试/盒	48 测试/盒
c.1510 反应液	Tris 缓冲液、dNTP、Mg ²⁺ 等	210μL ×1 管	420μL ×1 管	840μL ×1 管
c.1510 引物/探针	检测 1510 位点的引物和荧光探针	24μL ×1 管	48μL ×1 管	96μL ×1 管
酶混合液	Taq 酶、UNG 酶	6μL ×1 管	12μL ×1 管	24μL ×1 管

此文件由申请人或注册人提供

ALDH2 阳性质控品	含有目的基因片段的质粒 DNA	30μL ×1 管	60μL ×1 管	120μL ×1 管
阴性质控品	无核酸酶超纯水	30μL ×1 管	60μL ×1 管	120μL ×1 管

备注：不同批号试剂盒的各组分不可以互换。

需要但未提供的试剂：核酸提取试剂盒，详见【检验方法】4.1.3。

【储存条件及有效期】

-20±2℃避光储存条件下有效期 6 个月，避免反复冻融（冻融次数不宜超过 3 次）。产品有效期及失效日期见标签。

【适用仪器】

ABI7500、LightCycler480。

【样本要求】

- 适用样本类型：EDTA抗凝全血。
- 样本采集：取受检者静脉血2mL，收集于EDTA抗凝采血管（**禁止使用肝素抗凝采血管**）中，立即轻轻颠倒混合5~10次，使抗凝剂和静脉血充分混匀。
- 样本保存：样本采集后应及时提取并检测。样本在2~8℃保存不应超过24h，-20℃保存不应超过6个月；若长期保存，请置于-70℃，且避免反复冻融。

【检验方法】

所有试剂使用前须完全解冻，混匀后于6,000rpm离心数秒后备用。

1. 样本提取（样本准备区）

- 应用核酸提取试剂盒进行样本提取，提取的DNA应立即检测，否则应置于-20℃保存，保存时间不应超过6个月且避免反复冻融；提取的DNA浓度应不小于1ng/μL，且A₂₆₀/A₂₈₀应在1.8~2.0之间。
- 试剂盒阳性质控品和阴性质控品无需提取，直接使用即可。
- 与本试剂盒配套使用的核酸提取试剂盒有以下三款：QIAGEN公司生产的QIAamp DNA Mini Kit（货号51304）；生工生物工程（上海）股份有限公司生产的Ezup柱式血液基因组DNA抽提试剂盒（货号B518253）以及KURABO INDUSTRIES LTD.公司生产的QuickGene DNA whole blood kit S（货号DB-S）。

2. 试剂准备（试剂准备区）

取N个（N=阴性质控品数+待检样本数+阳性质控品数）PCR反应管，每管加入c.1510反应液17.5μL、c.1510引物/探针2μL、酶混合液0.5μL（也可按照每人份用量，计算N+1人份c.1510反应液、c.1510引物/探针、酶混合液各自所需总量，三者混匀离心后分装20μL至单个PCR反应管）。

3. 加样（样本准备区）

在上一步准备好的PCR反应管中分别加入阴性质控品、待检样本DNA、阳性质控品各5μL，总体系25μL/管（如下表），盖紧管盖，瞬时离心，移至扩增区进行PCR检测。

组分名称	单人份用量
c.1510 反应液	17.5μL
c.1510 引物/探针	2μL
酶混合液	0.5μL
模板	5μL
总体系	25μL

4. PCR扩增（扩增区）

将完成加样的PCR反应管放入荧光PCR仪内，总体系设为25μL。不同检测平台的设置如下。

4.1. ABI7500

- 新建1510A、1510G两个检测靶标，分配至所有1510位点检测孔；
- 检测靶标设置：

检测靶标	1510A	1510G
荧光基团	FAM	VIC
淬灭基团	None	None

4.1.3. 设置循环参数。

ABI7500 循环参数				
阶段	温度	时间	循环数	收集荧光信号
1	37℃	5min	1	否
2	95℃	2min	1	否
3	95℃	10s	45	否
	60℃	40s		★是
备注：参比荧光选 None。				

4.2. LightCycler480

- 检测格式选择“Dual Color Hydrolysis Probe / UPL Probe”；
- 将所有1510位点检测孔设为一个Subset，命名为“G1510A”；
- 荧光通道与检测靶标的对应关系同ABI7500，如下表：

Subset名称	FAM通道指示	VIC通道指示
G1510A	1510A	1510G

4.2.4. 设置循环参数。

LightCycler480 循环参数				
阶段	温度	时间	循环数	Acquisition Mode
1	37℃	5min	1	None
2	95℃	2min	1	None

3	94℃	10s	45	None
	60℃	40s		★Single
4	37℃	10s	1	None

5. 结果分析

5.1. ABI7500

- 将扩增曲线图谱类型设为线性;
- 依次选择1510A、1510G检测靶标进行基线和阈值设置,其中基线设为6~18或根据实际情况手动调整,阈值设为该检测靶标的所有检测孔 ΔRn (纵坐标)最大显示值的10%,设置完毕后分析,依次得到各检测靶标Ct值;
- 计算1510位点 ΔCt 值: $\Delta Ct_{1510} = Ct_{1510A} - Ct_{1510G}$, 当检测靶标无Ct值时,取其Ct值为45计算 ΔCt 值;
- 根据 ΔCt 值进行基因型判定。

5.2. LightCycler480

- 应用Abs Quant / Fit Points分析方法;
- 按照与ABI7500相同的设置方法,依次选择各检测靶标进行基线和阈值设置,分析得到各检测靶标Ct值;
- 计算1510位点 ΔCt 值(ΔCt_{1510}),并根据 ΔCt 值进行基因型判定。

6. 质量控制

- 阴性质控品:各检测靶标扩增曲线无指数增长期或 $Ct > 35$ 。
- 阳性质控品:各检测靶标扩增曲线有指数增长期且 $Ct \leq 35$ 。
- 以上两项须在同一次检验中同时满足,否则当次检验视为无效,需重新检测。

【阳性判定值或者参考区间】

应用 ΔCt 值进行基因型判定。

1510 位点基因型判定	
结果	1510 位点型别
$\Delta Ct_{1510} < -4$	AA 型
$-2 < \Delta Ct_{1510} < 2$	GA 型
$\Delta Ct_{1510} > 4$	GG 型

【检验结果的解释】

- 每次检验须设置阴性质控品和阳性质控品作为当次检验的质控,当质控结果满足【质量控制】要求时才可进行结果判定。
- 当被测样本检测结果符合以下情形之一时结果无效,需重新检测或重新提取后检测:
 - 同一反应孔的两个检测靶标结果均满足:扩增曲线无指数增长期或 $Ct > 35$;
 - ΔCt_{1510} 满足: $-4 \leq \Delta Ct \leq -2$ 或 $2 \leq \Delta Ct \leq 4$ 。
- 试剂盒检测人ALDH2基因G1510A多态性位点,检测结果对应

三种ALDH2基因型(如下表)。

	1510 位点型别	ALDH2 基因型
结果一	GG 型	ALDH2*1/*1 型
结果二	GA 型	ALDH2*1/*2 型
结果三	AA 型	ALDH2*2/*2 型

- 试剂盒检测结果仅供临床参考。

【检测方法的局限性】

- 本试剂盒仅限于说明书中规定的样本类型、适用机型、核酸提取试剂、检验方法、阳性判断值等。
- 本试剂盒仅对选定的多态性位点进行检测,若引物、探针区域有未知突变,可能会无检测结果或结果出现偏差。

【产品性能指标】

- 阴性符合率:试剂盒阴性符合率为100%。
- 阳性符合率:试剂盒阳性符合率为100%。
- 最低检测限:试剂盒最低检测限不大于1ng/μL。
- 精密性:试剂盒检测1ng/μL企业参考品10次,Ct值变异系数 $CV \leq 5\%$ 。
- 干扰物质:干扰物质(乙醇终浓度1%、NaCl终浓度10mM)不影响试剂盒检测结果。

【注意事项】

- 试剂盒使用前,请仔细阅读本说明书全文。
- 本产品不含核酸提取试剂,需要用户自备,详见【主要组成成分】。
- 请严格按照行业行政主管部门颁布的有关基因扩增检验实验室的管理规范执行。
- 本试剂盒为体外检测试剂,操作人员应经过专业培训。
- 整个检测过程应严格分在三个区进行:试剂准备区、样本准备区、扩增区,各区使用的仪器、设备、耗材和工作服应独立专用,实验后立即清洁工作台,并进行消毒。
- 使用一次性专用离心管、校准合格的移液器、带滤芯吸头和不含荧光物质的一次性手套等,手套须经常更换。
- 试剂盒中组分需在有效期内使用,不同批号的试剂请勿混用。
- 所有试剂使用前须完全解冻,混合均匀,6,000rpm离心数秒后使用。
- 操作台、移液器、离心机、PCR仪等仪器设备应经常用10%次氯酸钠或75%酒精、紫外线或臭氧消毒处理。
- 反应管中应尽量避免气泡存在,管盖需盖紧。
- 扩增完毕后取出反应管,密封在专用塑料袋内,丢弃于指定地点。
- 本试剂盒涉及的待检样本应视为具有传染性物质,操作和处理均需符合卫生部《微生物生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废弃物管理条例》相关要求。

【参考文献】

- Ikawa M, Wang G, et al. *Journal of Biological Chemistry*, 1983, 258(10):6282-6287.
- Ohta S, Ohsawa I, et al. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010, 1011(1):36-44.
- Chen Z, Zhang J, Stamler J S. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(12):8306-8311.
- Guo R, Chen L, et al. *Journal of the American College of Cardiology*, 2008, 52(11):953-960.
- 药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南(试行)(国卫医卫便函(2015)240号)。

【基本信息】

生产企业名称:武汉明德生物科技股份有限公司
住所:武汉市东湖开发区关东科技园东信路特1号留学生创业园E栋2楼
联系方式:
售后服务单位名称:
联系方式:
生产地址:武汉市东湖开发区高新大道858号光谷生物医药产业园二期A8 2-2栋3-4楼
生产许可证编号:

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准日期及修改日期】