

人类 ALDH2 基因检测试剂盒（PCR-荧光探针法） 说明书

【产品名称】

通用名称：人类 ALDH2 基因检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

20 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒适用于定性检测人类 EDTA、柠檬酸盐抗凝新鲜静脉全血样本 DNA 中 ALDH2 基因 ALDH2*2 位点多态性。

本试剂盒仅用于临床辅助诊断，检测结果仅代表对人类 ALDH2 基因的检测结果，为临床医生个体化用药提供参考。具体临床应用时，临床医生需结合病例的实际情况进行判断，不能以本试剂盒检测结果作为临床诊断的唯一依据。

人类乙醛脱氢酶（aldehyde dehydrogenase, ALDH）是一种催化乙醛以及其他脂肪族醛氧化的四联体蛋白酶。目前，已发现有 19 种 ALDH 同工酶，研究较为深入的主要有对乙醛亲和力和较弱的胞质同工酶 ALDH1 和线粒体同工酶 ALDH2，其中 ALDH2 在肝脏和胃中具有很高的表达量，是人体乙醇代谢途径中关键酶之一^[1]。

人类 ALDH2 基因位于人类第 12 号染色体的 12q24.2，主要是 rs671，即位于第 12 个外显子内的单碱基突变 G1510A。正常的等位基因为野生型 ALDH2*1，变异的等位基因为突变型 ALDH2*2。

研究显示，突变型基因 ALDH2*2 的存在导致乙醛脱氢酶活力的严重缺失。在饮酒人群中，尤其是重度饮酒者，ALDH2 基因与酒精性中毒、酒精性肝病（alcoholic liver disease, ALD）、消化道癌症等疾病密切相关^[1,2]。

人类 ALDH2 基因同时也是硝酸甘油（GTN）有效代谢物 NO 形成的关键。硝酸甘油（GTN）是治疗心绞痛的经典药物，但该药的临床有效性常因人而异，部分病人舌下含服硝酸甘油不能迅速有效地缓解心绞痛，使心肌严重缺血加重。研究发现，ALDH2*1 基因型的患者硝酸甘油治疗心绞痛的疗效明显优于 ALDH2*2 患者，ALDH2*2 突变型的患者使用无效率达到 42.4%，大约为 ALDH2 野生型的 3 倍^[3]。因此，存在突变型 ALDH2*2 的患者硝酸甘油用药剂量及用药频率应相应增加，延长用药周期。

本试剂盒针对人类 ALDH2 基因 ALDH2*2 位点的多态性进行定性检测（见表 1），本产品尚未与具体药物联合进行临床试验，仅针对靶基因突变的检测性能进行了临床验证。

表 1：本试剂盒检测 ALDH2 基因类型

基因	基因	碱基	检测通道
ALDH2	ALDH2*2 1510G	GAA	FAM
	ALDH2*2 1510A	AAA	VIC

【检验原理】

本试剂盒针对人类 ALDH2 基因 ALDH2*2 位点的不同，设计 1 套特异性引物和探针组合，一个反应体系中通过两种不同通道检测一个位点的基因。在反应体系中含有不同基因型模板的情况下，PCR 反应得以进行并释放不同的荧光信号。利用仪器对 PCR 过程中相应通道的信号强度进行实时监测和输出，实现检测结果的定性分析。

【主要组成成分】

试剂盒采用 PCR 反应预混液设计，内装有 ALDH2 基因检测试剂。试剂盒主要由 PCR 反应液、阳性对照和空白对照组成。本试剂盒未包括商业化血液基因组 DNA 提取试剂盒（天根生化科技（北京）有限公司，货号 DP318 或 DP348）、8 联 PCR 管（规格 0.1mL，厂家 BIOplastic，货号 B72719、B57801；规格 0.2mL，厂家 生工生物工程(上海)股份有限公司，货号 F602003）或 96 孔 PCR 板（规格 0.1mL，厂家 BIOplastic，货号 B17489；规格 0.2mL，厂家 ABI，货号 4316813）等实验所需试剂及耗材。

试剂盒 PCR 反应液中包含 PCR 缓冲液、dNTPs、特异性引物和探针、内标引物、探针、Taq 酶、UNG 酶，具体组成见表 2。

表 2：试剂盒组成

管号	标签名称	主要组成成分	装量规格 (20 人份/盒)
1	ALDH2*2 反应液	PCR 缓冲液、dNTPs、特异性引物和探针、内标引物、探针、Taq 酶、UNG 酶	1 管（480μL）

2	阳性对照	ALDH2*2 1510G 和 ALDH2*2 1510A 的质粒混合液	1 管（200μL）
3	空白对照	Tris-HCl 缓冲液(10mM)	1 管（200μL）

【储存条件及有效期】

- 20±5℃避光保存，有效期 9 个月。
- 试剂盒在使用时应尽量减少试剂冻融次数，并保证不多于 6 次冻融。
- 生产日期及有效期至：见标签。

【适用仪器】

- 本试剂盒适用于 Stratagene MX3000P、AB 7500、LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪。
- 本试剂盒要求仪器使用 FAM、VIC 通道采集不同的 ALDH2 基因扩增荧光信号，使用 ROX 通道采集内标基因扩增荧光信号。

【样本要求】

本试剂盒适用于从 2mL EDTA、柠檬酸盐抗凝新鲜静脉全血中提取的人类基因组 DNA 的检测。要求 DNA 的 A260/A280 在 1.6~2.0 之间，DNA 样本-20℃以下保存不多于两年，冻融次数不超过 6 次。

【检验方法】

- 试剂准备：（试剂准备区）
 - 从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温（20±5℃），各组充分溶解，快速离心 10 秒。
 - 核算当次实验所需要的反应数（n），按照 23μL/孔分装量将反应液分装到 n 个反应管内。PCR 反应管转移至样本准备区，剩余试剂放回-20℃±5℃冰箱冷冻避光保存。
$$n = \text{样本数} + \text{空白对照 (1T)} + \text{阳性对照 (1T)}$$
- 样本准备：（样本准备区）
 - 样本 DNA 提取：参考所购买的商用基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行操作。推荐使用天根生化科技（北京）有限公司血液基因组提取试剂盒（TIANamp Blood DNA Kit，DP318 或 DP348）用于血液基因组 DNA 的提取。
 - 加样：
 - 将待测样本的基因组 DNA、阳性对照、空白对照，分别加入已装有 PCR 反应液的反应管中，即每个待测样本分别用此 PCR 反应液进行检测，加入量为 2μL/孔。待测样本的基因组 DNA 推荐浓度为 5-15ng/μL。
 - 盖好 PCR 反应管盖，记录样本加样情况。将 PCR 反应管转移到核酸扩增区进行上机检测。若 PCR 反应管内加入模板后遇临时情况不能立即上机，建议将加好模板的 PCR 反应管放于 2~8℃条件暂时保存，并在 24 小时内尽快上机检测。
- PCR 扩增：（核酸扩增区）
 - 开机，并进行仪器性能自检。
 - 取样本准备区准备好的 PCR 反应管，放置在仪器样品槽相应位置。并记录放置顺序。
 - 按表 3 设置仪器扩增相关参数，并开始进行 PCR 扩增。反应结束后，根据扩增曲线，划定合适基线（一般起始设定为 3，终止设定为 15）和荧光阈值（一般将阈值划定在扩增曲线对数形式下指数增长长期的中间），得到不同通道 Ct 值并按照表 4 进行结果判定。

表 3：仪器扩增相关参数

体系	总体积为 25μL		
信号采集	ALDH2*2 反应液	ALDH2*2 1510G—FAM 通道采集荧光信号	
		ALDH2*2 1510A—VIC 通道采集荧光信号	
	内标系统	内标基因—ROX 通道采集荧光信号	
PCR 反应条件	阶段	条件	循环数
	UNG 处理	37℃：10 分钟（min）	1
	预变性	95℃：5 分钟（min）	1
		95℃：15 秒（s）	40
	PCR	60℃：60 秒（s） （设置在此阶段结束时采集荧光信号）	

【检验结果的解释】

- 试剂盒有效性判定：
 - 阳性对照：FAM、VIC、ROX 通道 Ct 值 ≤ 32 ，扩增曲线有明显指数增长期。
 - 空白对照：FAM、VIC、ROX 通道无扩增曲线，或者扩增曲线为直线或轻微斜线，无明显指数增长期，无 Ct 值或 Ct 值 ≥ 38 。
- 样本有效性的判定：
 - 内标基因：所有样本检测中 ROX 通道 Ct 值 < 38 ，扩增曲线有明显指数增长期。
- 检测结果的判定：
 按照下表 4 对样本检测结果进行判定，确定样本基因型。

表 4：结果判定

反应液	基因型	FAM 通道	VIC 通道
ALDH2*2 反应液	ALDH2*2 位点 G/G 纯合野生	Ct 值 ≤ 36	Ct 值 > 36 或无 Ct 值
	ALDH2*2 位点 G/A 杂合突变	Ct 值 ≤ 36	Ct 值 ≤ 36
	ALDH2*2 位点 A/A 纯合突变	Ct 值 > 36 或无 Ct 值	Ct 值 ≤ 36

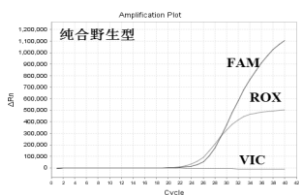


图 1 纯合野生型样本检测示意图

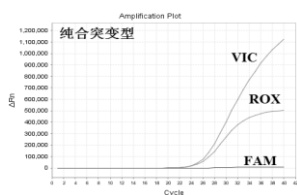


图 2 纯合突变型样本检测示意图

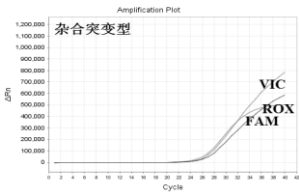


图 3 杂合突变型样本检测示意图

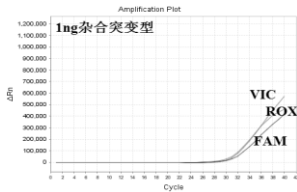


图 4 Ing 杂合突变型样本检测示意图

【检验方法的局限性】

- 样本检测结果与样本的收集、处理和保存过程有关，其中任何失误都将导致检测结果的不准确。如果样本处理时未控制好 DNA 的质量，可能出现假阴性的结果。
- 样本检测结果为野生型时，并不能排除被检测者带有 ALDH2 基因其他位点突变类型。
- 本试剂盒检测结果仅供临床参考，用于指导个体化用药，不得作为临床诊治的唯一依据。对患者应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
- 本试剂盒仅限于从 EDTA、柠檬酸盐抗凝新鲜静脉全血中提取的人类基因组 DNA 的检测；检测系统仅适用于 Stratagene MX3000P、AB 7500、LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪；使用商业化血液基因组 DNA 提取试剂盒（推荐使用天根生化科技（北京）有限公司的血液基因组 DNA 提取试剂盒系列，如 DP318、DP348）进行血液样本基因组 DNA 提取；应严格按照说明书要求进行样本检测。

【产品性能指标】

- 试剂盒包装完整，无内容物溢出；标签外观完整，无脱落，标签标识内容清晰；试剂盒内组成正确，无重复、缺失组份的情况。
- 使用试剂盒反应液检测 ALDH2 基因突变型参考品，应检测出对应突变。
- 使用试剂盒反应液检测 ALDH2 基因野生型参考品，应不得检出突变。
- 试剂盒检测限可达到：200copies/ μ L 样本中能准确检测出对应基因型。
- 使用试剂盒重复检测对应基因型参考品 10 次，应检出对应基因型，且检测结果 Ct 值变异系数 CV $\leq 5\%$ 。

【注意事项】

- 本试剂盒仅供体外诊断使用。
- 临床实验室应严格按照《医疗机构临床基因扩增管理办法》（卫办医政发【2010】194 号）等有关分子生物学实验室、临床基因扩增实验室的管理规范执行。

- 不同批号试剂不能混用。
- 本试剂盒内阳性对照不具有传染性，但在使用时建议将其视为具有潜在传染性物质进行处理。
- 本试剂盒内用剩的试剂及实验过程中的废弃物建议按照医疗废弃物进行处理。
- 实验时注意防止外源 DNA 酶对试剂的污染，避免 DNA 降解，保证 DNA 质量。对于提取质量较差的样本，应相应增加 DNA 用量。
- 实验完毕用 10%次氯酸或 75%酒精或紫外灯处理工作台和移液器。
- 所有化学药品都具有潜在的危险性。只有经过培训，具有相应实验室技术的人员才能使用本试剂盒。操作时，请穿着合适的工作服、并佩戴一次性手套。

【标识的解释】

符号	意义
IVD	体外诊断医疗器械

【参考文献】

- Zhang Y and Ren J. ALDH2 in alcoholic heart diseases: molecular mechanism and clinical implications. Pharmacol Ther, 2011. 132(1):86-95.
- Goedde H W, Agarwal D P, Fritze G, et al. Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations. Hum Genet, 1992. 88(3):344-6.
- Li Y, Zhang D, Jin W, et al. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) Glu504Lys polymorphism contributes to the variation in efficacy of sublingual nitroglycerin. J Clin Invest, 2006. 116(2):506-11.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：武汉友芝友医疗科技股份有限公司

住所：武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号武汉光谷国际生物医药企业加速器 1.2 期 23 栋 1 单元 4、5 层

联系方式：027-65330996

售后服务单位名称：武汉友芝友医疗科技股份有限公司

联系方式：027-65330996

生产地址：武汉市东湖新技术开发区高新大道 858 号生物医药园加速器一期 A4 栋西侧 1 楼

生产许可证编号：鄂食药监械生产许 20120580 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准 20173401325

【说明书核准及修改日期】

2022 年 07 月 19 日