

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：ALDH2 基因多态性检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）

【包装规格】

48 测试/盒

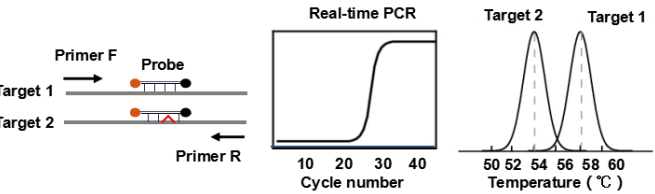
【预期用途】

用于定性检测人外周静脉血 DNA 中 ALDH2*2 (c.1510G>A) 位点的多态性，可区分野生型、杂合突变型和纯合突变型。

ALDH2 是催化冠心病心绞痛治疗药物硝酸甘油代谢为活性成分的主要酶 [1-2]。*1 和 *2 是中国人常见的等位基因：*1 为正常型；*2 为突变型，造成编码的多肽链第 504 位 Glu 被 Lys 取代，引起酶活性降低，进而导致硝酸甘油代谢速率大大降低，难以发挥功效 [3]。亚洲人群中，30%-50% 携带等位基因 *2 [4]。

【检验原理】

本试剂盒采用荧光 PCR 熔解曲线法（原理如下图）。首先用特异性引物扩增人 ALDH2 基因，然后进行熔解曲线分析，最后根据不同基因型模板与特定探针杂交体熔解过程中的 T_m 值的差异来判断样本的 ALDH2*2 (c.1510G>A) 位点的多态性。对于每一份样本，本试剂盒仅需一管对其进行检测，对应扩增试剂中的 ALD PCR 反应管。



【主要组成成分】

组成	组分名称	主要成分	规格	数量
扩增试剂	ALD PCR 反应管	引物、探针 (ROX 标记)、dNTPs、酶	8 测试/条	6 条
	ALD 野生型对照	野生型质粒	10 测试/支	1 支
对照试剂	ALD 阴性对照	DNA 溶解液	10 测试/支	1 支
	PCR 八联管盖	透明 PCR 八联管管盖	8 测试/条	6 条

注：建议不同批号组分之间不互换。

核酸提取试剂未包含在本试剂盒中。使用厦门致善生物科技股份有限公司的 Lab-Aid 824 全血基因组 DNA 提取试剂（备案号：闽厦械备 20170144 号）。

【储存条件及有效期】

本试剂盒于 -25~8℃ 避光保存，有效期为 18 个月。试剂盒开封后，未使用完的 PCR 反应管应放回铝箔自封袋（封紧自封条）并置于 8℃ 以下避光保存；若未使用完的 PCR 反应管外的泡罩包装完整，则保存期限为 7 个月；若未使用完的 PCR 反应管外的泡罩包装已拆开，则保存期限为 3 个月。试剂盒可于 -18℃~37℃ 的温度范围内运输，运输时间 ≤ 12 天。生产日期及失效日期见包装标签。

【适用仪器】

经验证可用的仪器为全自动医用 PCR 分析系统（SLAN-96S；上海宏石医疗科技有限公司）。

【样本要求】

适用于人外周静脉血样本，采用 EDTA 抗凝，采血体积应不低于 200 μL。采集后的血样在 2~8℃ 温度下可保存 5 天。若无法及时对样本进行 DNA 提取，

可将样本置于 -20℃ 以下保存，冻融次数 ≤ 5 次，保存时间 ≤ 6 个月。样本的提取方法及要求见检验方法中的样本提取及加样。

【检验方法】

1. 试剂准备——配液区

- ① 首先从试剂盒中取出铝箔袋，撕开封口，打开自封条，然后打开 ALD PCR 反应管的泡罩包装，取出 n 测试试剂（n 根据当次实验需要确定）。剩余试剂应放回铝箔自封袋并将封条封紧，于 2~8℃ 避光保存。
- ② 从试剂盒中取出 n 测试透明 PCR 八联管管盖（n 根据当次实验需要确定），剩余管盖应放回相应的自封袋。
- ③ 将待用的 ALD PCR 反应管、透明 PCR 八联管管盖、ALD 野生型对照和 ALD 阴性对照转移至提取间，于 2~8℃ 避光保存直至样本提取完。

2. 样本提取及加样——提取区

- ① 使用厦门致善生物科技股份有限公司的 Lab-Aid 824 全血基因组 DNA 提取试剂（备案号：闽厦械备 20170144 号）提取人基因组 DNA。提取后的人基因组 DNA 可暂放置在 2~8℃ 保存，并于 2 周内完成检测。若需长期保存人基因组 DNA，可于 -20℃ 以下保存，冻融次数 ≤ 5 次，保存时间 ≤ 12 个月。
- ② 打开原装的 ALD PCR 反应管管盖并丢弃，用微量加液器向每支 PCR 薄壁反应管中加入 25 μL 相应的 DNA 样本或阴性/野生型对照品，之后立即用待用的透明 PCR 八联管管盖盖严。

注：本试剂盒采用野生型对照和阴性对照进行质量控制，因此每次实验应设置野生型和阴性对照。阴性/野生型对照在第一次使用前，需先离心 1min，然后分别加入 250 μL 的纯化水进行溶解，充分振荡混匀 20 s，瞬时离心。溶解后的阴性/野生型对照品于 -18℃ 以下贮存，反复冻融 ≤ 4 次。

- ③ 将已加入模板的 PCR 薄壁反应管于涡旋振荡器中充分振荡混匀 20 s，瞬时离心数秒后，除去气泡。

- ④ 将离心后的 PCR 薄壁反应管转移至 PCR 扩增区。

3. PCR 扩增及熔解曲线分析——扩增区

扩增与熔解曲线分析步骤为一个程序，在全自动医用 PCR 分析系统（SLAN-96S；上海宏石医疗科技有限公司）上连续完成。

① 反应程序设定如下：

阶段	条件	循环数
UNG 酶处理	50℃ 2 分钟	1
预变性	95℃ 10 分钟	1
降落循环	95℃ 15 秒	10
	65℃ 15 秒（每个循环下降 1℃）	
	76℃ 20 秒	
PCR 循环	95℃ 15 秒	50
	55℃ 26 秒（可设置在此阶段采集荧光）	
	76℃ 20 秒	
	95℃ 1 分钟	
熔解曲线分析	45℃ 3 分钟	1
	45℃~85℃，设置在此阶段采集 ROX 通道荧光信号，升温速率：	
	0.04℃/s	

- ② 程序运行完毕，将 PCR 薄壁反应管（闭管）取出放入凹凸袋，将封口封严，按污染源处理。

【参考区间】

在检测体系中，野生型特征峰在 ROX 通道的熔点 (T_m) 参考值范围如下：ROX 通道：64.88℃~66.69℃；

在检测体系中多态性位点的 ΔT_m 参考值范围如下：

ROX 通道：4.95℃~6.22℃；

本说明书中各 T_m 值是在全自动医用 PCR 分析系统（SLAN-96S；上海宏石医疗科技有限公司）上所得的常见值作为参考值。

T_m 值以仪器自动判读所得为准, 当仪器给出一个以上 T_m 值时, 请参考野生型对照和阴性对照的峰形选择有效 T_m 值。

【检验结果的解释】

每次实验应设置野生型对照和阴性对照, 且检测结果须满足以下条件: 野生型对照在 ROX 通道应有熔解峰且熔点在野生型特征峰的熔点参考值范围内, 阴性对照应无熔解峰, 则该次实验有效, 可继续进行待测样本的判读。

若待测样本在 ROX 通道无熔解峰, 表明样本基因组有问题【浓度低于检测限或质量达不到要求, 建议重新提取 DNA 并重新进行检测】, 检测结果无效。

若待测样本在 ROX 通道有熔解峰, 则包括以下几种情况:

- ① 只有一个熔解峰, 且熔点峰值 (T_m 值) 在野生型特征峰熔点参考值范围内, 则该熔解峰为野生型特征峰 (用 “W” 表示), 该样本为野生型 (ALDH2 *1/*1; 图 1 黑色曲线所示)。
- ② 只有一个熔解峰, 且熔点峰值不在野生型特征峰熔点参考值范围内, 但该次实验野生型对照的熔点峰值减去样本的熔点峰值的差值 (ΔT_m) 在 4.95°C ~ 6.22°C 范围内, 则该熔解峰为突变型特征峰 (用 “P” 表示), 该样本为纯合突变型 (ALDH2 *2/*2; 图 1 红色曲线所示)。
- ③ 有两个熔解峰, 其中高熔点峰值在野生型特征峰熔点参考值范围内, 且高熔点峰减去低熔点峰的差值 (ΔT_m) 在 4.95°C ~ 6.22°C 范围内, 则该样本既含有野生型特征峰, 又含有突变型特征峰, 为杂合突变型 (ALDH2 *1/*2; 图 1 绿色曲线所示)。
- ④ 若待测样本熔解峰均不符合以上 3 种情况, 则建议重新提取 DNA 并重新检测; 若重检结果仍不符合, 则可能存在未知突变, 建议采用测序或其它方法进行确认。

注意: 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。

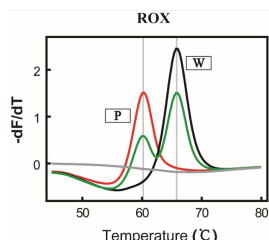


图 1 典型的样品检测结果

【检验方法的局限性】

1. 探针覆盖区域内可能发生除 c.1510G>A 之外的未知突变, 出现此情况时请用测序或其它方法进一步验证。
2. 本试剂盒检测结果仅供临床参考, 不作为患者个体化治疗的唯一依据, 临床医生应结合患者病情、药物适应症、治疗反应及其它实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

【产品性能指标】

1. 准确性: 检测企业参考品盘中的野生型参考品、杂合突变型参考品和纯合突变型参考品 (均为试剂盒检测范围内人 ALDH2 分型参考品), 检测结果应均为相应基因型。
2. 检测限: 检测浓度不高于 $1\text{ ng}/\mu\text{L}$ 的人 ALDH2 分型检测限参考品, 结果应均为相应基因型。
3. 特异性: 1) 交叉反应: 检测企业参考品盘中的特异性参考品 (非人类基因组和本试剂盒检测范围外多态位点的阴性参考品), 结果应均为阴性, 无交叉反应。2) 干扰试验: 样本中常见的干扰物质, 包括: 总胆红素 ($170.0\text{ }\mu\text{mol/L}$)、胆固醇 (8.0 mmol/L)、白蛋白 (100.0 g/L)、血红蛋白 (200 g/L)、

甘油三酯 (12.0 mmol/L)、抗凝剂 (15 g/L) 和常用药物硝酸甘油对检测结果均无影响。

4. 重复性: 检测企业参考品中的重复性参考品各 10 次, 检测结果一致, T_m 值的变异系数 (CV) $\leq 5\%$, 且为对应基因型。
5. 临床评价: 本产品在三家临床单位共检测了 1112 例临床样本, 与 Sanger 基因测序法及竞品试剂盒的检测结果对比, 本产品的临床灵敏度为 100%, 特异性为 100%, 总符合率为 100%, Kappa 系数为 1。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断, 操作人员必须经过培训且具有一定的经验, 试剂盒使用前请仔细阅读说明书。
2. 请严格按照基因扩增检验实验室的管理规范进行试验操作: 如 PCR 试验严格分区操作: 各区应有专用的手套、移液器等, 不得交叉使用, 避免污染; 工作人员应遵循从一区到二区的单方向工作原则, 各工作区相对隔离; 进行 PCR 试验的工作桌面及相关物品应定期用 1% 次氯酸钠、75% 酒精、1 M 盐酸或紫外灯进行灭菌和消毒。
3. 试验操作所需的消耗用品应一次性使用, 使用前进行无菌处理。
4. 冻存的阴性/野生型对照品溶液在使用前应充分融化, 并振荡混匀, 短暂离心。PCR 反应管加入模板后应充分振荡混匀并瞬时离心, 上机前应避免振荡, 应注意检查各反应管是否盖紧, 以免污染仪器。
5. PCR 反应管应避光保存, 每次试验应设置阴性和野生型对照。
6. 不同批号的试剂请勿混用, 请在有效期内使用试剂盒。
7. 对照品尽量避免反复冻融, 应控制反复冻融 ≤ 4 次。如果需要多次使用, 请在第一次溶解后将野生型对照分装冻存, 再根据需要取用。
8. 反应结束后, 需将 PCR 薄壁反应管 (闭管) 取出放入凹凸袋, 将封口封严, 按污染源处理。

【参考文献】

1. 药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南 (试行)
2. 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]. Journal of Clinical Investigation, 2006, 116(2):506-11.
3. Chen Z, Zhang J, Stamler J S. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(12):8306.
4. Goedde, H.W., et al. Population genetic studies of aldehyde dehydrogenase isozyme deficiency and alcohol sensitivity [J]. American Journal of Human Genetics, 1983, 35:769-772.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 厦门致善生物科技股份有限公司
住所: 厦门火炬高新区 (翔安) 产业区翔安北路 3701 号之 1 号楼
联系方式: 400-661-8810; 0592-7615088
售后服务单位名称: 厦门致善生物科技股份有限公司
联系方式: 0592-7615088
生产地址: 厦门火炬高新区 (翔安) 产业区翔安北路 3701 号之 1 号楼
生产许可证编号: 闽药监械生产许 20100283 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准 20213400004

【说明书核准日期及修改日期】

2021 年 1 月 5 日