

人 ALDH2 基因检测试剂盒(荧光 PCR 熔解曲线法)说明书

【产品名称】

通用名称：人 ALDH2 基因检测试剂盒(荧光 PCR 熔解曲线法)

【包装规格】

6 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样本中 ALDH2 基因 c.1510 G>A 位点（ALDH2\*2）的多态性。

本产品用于硝酸甘油的用药指导。本产品不能预测患者对硝酸甘油的应答情况，仅能辅助医生确定硝酸甘油治疗策略。本产品检测结果仅供临床参考，不应作为患者用药的唯一依据，临床医生应结合患者病情、疗效及其他实验室检测指标对本产品的检测结果进行综合判断。

ALDH2\*2（Glu504Lys，rs671）多态导致所编码蛋白质 504 位谷氨酸被赖氨酸所取代，携带突变等位基因（ALDH2\*2）的个体 ALDH2 酶活性下降，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。因此，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<sup>[1]</sup>。杂合突变型 ALDH2\*1/\*2 在中国人群的发生频率为 23.94%，纯合突变型 ALDH2\*2/\*2 在中国人群的发生频率为 1.79%<sup>[2]</sup>。

本试剂盒预期人群为正在服用硝酸甘油或将要服用硝酸甘油的患 者，包括冠状动脉粥样硬化性心脏病、心绞痛、高血压充血性心力衰竭等疾病人群。报道显示，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<sup>[1]</sup>。

【检验原理】

本试剂盒采用荧光 PCR 熔解曲线法，采用特异性引物扩增目的基因，再利用荧光标记探针与 PCR 产物形成的双链杂交体，根据双链杂交体的熔点不同，通过分析熔解曲线判断目的基因是否存在突变及相应的突变类型。

【主要组成成分】

主要组成成分见表 1。

表 1 试剂盒主要组成成分

| 试剂盒组成   | 规格（管）  |         | 主要成分                       |
|---------|--------|---------|----------------------------|
|         | 6 人份/盒 | 48 人份/盒 |                            |
| PCR 混合液 | 105μL  | 840μL   | 脱氧核糖核苷三磷酸（dNTPs）、缓冲液、引物、探针 |
| DNA 聚合酶 | 3μL    | 24μL    | DNA 聚合酶（Taq 酶）             |
| 野生型对照   | 25μL   | 25μL    | ALDH2 1510 GG 质粒           |
| 突变型对照   | 25μL   | 25μL    | ALDH2 1510 AA 质粒           |

注：不同批号组分之间不能互换。

需要但未提供的材料:

- 1) 空白对照品可采用灭菌注射用水, 请用户自备。
- 2) 核酸提取或纯化试剂【备案号: 粤穗械备 20170053 号】或核酸提取或纯化试剂【备案号: 粤潮械备 20210003】

#### 【储存条件及有效期】

-15℃以下保存, 有效期 12 个月。

避免反复冻融, 冻融次数不超过 6 次。

生产日期: 见标签。

有效期至: 见标签。

#### 【适用仪器】

荧光 PCR 仪: 上海宏石 SLAN-96S; Roche Light Cycler 480 II。

#### 【样本要求】

本试剂盒适用于人全血 (Na<sub>2</sub>EDTA 抗凝或 K<sub>2</sub>EDTA 抗凝) 样本的检测。检测前需提取样本中人类基因组 DNA, 具体方法及要求参见检验方法中样本准备。建议全血样本采集后若未能立即提取, 可于 2~8℃ 保存并在 7 天内完成提取; 或于 -15℃ 以下保存, 并在 6 个月内完成提取。样本冻融次数应不超过 5 次。样本运输遵循于 2013-06-01 实施的《血液运输要求 WS/T 400-2012》要求进行低温运输。

#### 【检验方法】

##### 一、样本准备 (标本制备区)

1. 参考所购买的商用基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行操作。使用广州凯普医药科技有限公司的核酸提取或纯化试剂 (产品备案号: 粤穗械备 20170053 号) 或潮州凯普生物化学有限公司的核酸提取或纯化试剂 (产品备案号: 粤潮械备 20210003) 提取样本 DNA。空白对照需参与提取。

2. 取 2μL 抽提好的 DNA 样本作为模板进行 PCR 扩增; 剩余 DNA 样品存储于 -15℃ 以下备用, 冻融次数不超过 5 次, 保存时间不超过 6 个月。

##### 二、扩增试剂准备 (试剂准备区)

1. 从试剂盒中取出 PCR 混合液, 室温下避光解冻, 上下颠倒混匀后, 8000 转/分钟离心 10 秒。从试剂盒中取出 DNA 聚合酶, 8000 转/分钟离心 10 秒。然后按照表 2 配制扩增试剂。

表 2 扩增试剂的制备

| 组份     | PCR 混合液 | DNA 聚合酶 |
|--------|---------|---------|
| 1 人份用量 | 17.5μL  | 0.5μL   |
| 10人份用量 | 175μL   | 5μL     |

2. 将配制好的扩增试剂充分混匀, 8000 转/分钟离心 1 分钟, 向设定的 n 个 PCR 反应管, 分别加入 18μL 配制好的扩增试剂, 转移到样品处理区。

##### 三、加样 (标本制备区)

1. 在对应的 PCR 反应管中分别加入 2μL 处理好的样本 DNA、野生型对照、

突变型对照、空白对照，盖紧管盖，稍做离心。（反应总体积为20μL/人份）

2. 转移到检测区，放入相应的荧光 PCR 检测仪内，记录样本摆放顺序。

#### 四、PCR 扩增与熔解曲线分析（扩增区）

扩增与熔解曲线分析步骤程序设定见表 3，荧光信号采集通道为 FAM 通道。上海宏石 SLAN-96S 的检测模式为标准熔解曲线，Roche LightCycler 480 II 的检测模式为 Mono Color Hydrolysis Probe/UPL Probe。

表3 扩增程序的设定

| 程序         | 循环数 | 温度      | 时间         | 采样模式             |
|------------|-----|---------|------------|------------------|
| 1          | 1   | 95℃     | 10 min     | 无                |
| 2          | 45  | 95℃     | 15 sec     | 无                |
|            |     | 56℃     | 20 sec     | 采集荧光             |
|            |     | 72℃     | 20 sec     | 无                |
| 3          | 1   | 95℃     | 1 min      | 无                |
| 4          | 1   | 40℃     | 3 min      | 无                |
| Melt curve | 1   | 40℃→80℃ | Continuous | 0.05℃/ sec连续采集荧光 |

#### 【阳性判断值】

本试剂盒是定性检测试剂，不能用于定量检测。本说明书中各 $T_m$ 值是在上海宏石 SLAN-96S 仪器上所得的常见值作为参考值，见表4。当使用 Roche LightCycler 480 II 时， $T_m$ 值可能略有变动，以当次试验野生型对照和突变型对

照的 $T_m$ 值为准。

当仪器给出一个以上 $T_m$ 值时，请参考野生型对照、突变型对照的峰型选择有效 $T_m$ 值。当出现仪器无法自动给出 $T_m$ 值的情况时，可通过调整基线或直接人工判读的方法获得 $T_m$ 值。

表4  $T_m$ 参考值

| 通道  | 检测项              | $T_m$ 参考值(℃)              |
|-----|------------------|---------------------------|
| FAM | ALDH2 c.1510 G>A | 突变型对照熔解峰 $T_m$ : 53.5±1.5 |
|     |                  | 野生型对照熔解峰 $T_m$ : 59.5±1.5 |

#### 【检验结果的解释】

1. 野生型对照 ALDH2 c.1510 G>A 检测位点的熔解峰为单峰且 $T_m$ 值符合表4所示的相应 $T_m$ 参考值范围；突变型对照 ALDH2 c.1510 G>A 检测位点的熔解峰为单峰且 $T_m$ 值符合表4所示的相应 $T_m$ 参考值范围。空白对照无熔解峰。

2. 当野生型对照和突变型对照的熔解峰 $T_m$ 值符合表4所示的 $T_m$ 值范围，即可对待测样本进行分析：

(1) 若样本有熔解峰，判读如下：

| 样本熔解峰类型 | $\Delta T_m$ 类型       | 结果判读  |
|---------|-----------------------|-------|
| 左单峰     | 样本熔解峰—突变型对照熔解峰   ≤1.5 | 纯合突变型 |
|         | 样本熔解峰—突变型对照熔解峰   >1.5 | 重新检测* |
| 右单峰     | 样本熔解峰—野生型对照熔解峰   ≤1.5 | 野生型   |
|         | 样本熔解峰—野生型对照熔解峰   >1.5 | 重新检测* |

|    |                               |       |
|----|-------------------------------|-------|
| 双峰 | 样本熔解峰—突变型对照熔解峰   $\leq 1.5$ 且 | 杂合突变型 |
|    | 样本熔解峰—野生型对照熔解峰   $\leq 1.5$   |       |
|    | 样本熔解峰—对应的对照熔解峰   $> 1.5$      | 重新检测* |

注：“\*”表示 $\Delta T_m > 1.5^\circ\text{C}$ 时，重新对该样本 DNA 进行检测，若再次检测的 $\Delta T_m$ 仍大于 $1.5^\circ\text{C}$ ，则重新提取 DNA 进行检测。

(2) 若检测结果无熔解峰，重新检测样本 DNA，必要时重新提取 DNA 进行检测。

本试剂盒检测结果分析参照表 5，检测基因扩增熔解曲线结果见图 1。

表 5 结果分析

| 通道  | 检测项              | 突变型<br>熔解峰 | 野生型<br>熔解峰 | 结果        |
|-----|------------------|------------|------------|-----------|
| FAM | ALDH2 c.1510 G>A | +          | -          | 纯合突变型(AA) |
|     |                  | -          | +          | 野生型(GG)   |
|     |                  | +          | +          | 杂合突变型(GA) |

注：“+”表示有熔解峰，“-”表示无熔解峰。

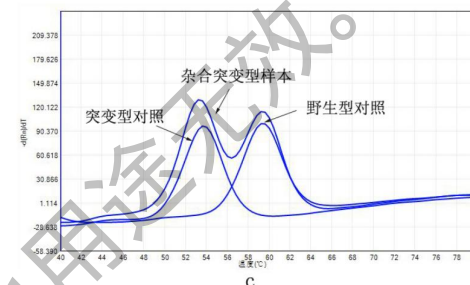


图 1 本试剂盒样本检测结果图示

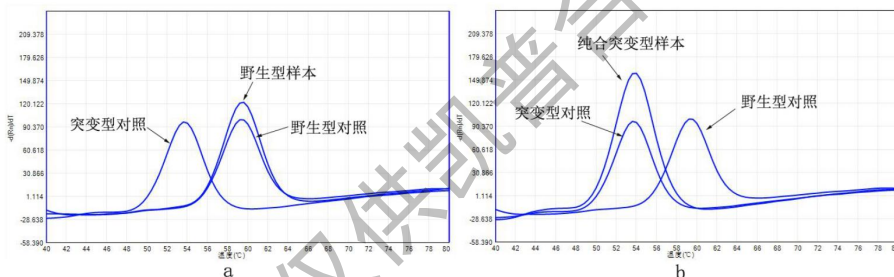
注：a、b、c 对应 ALDH2 c.1510 G>A 位点 (FAM 通道)

#### 【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒检测结果用于辅助指导临床治疗药物的选择，仅供临床参考不得作为临床诊治的唯一依据。
2. 本试剂盒所设计引物探针序列区域若存在其他基因变异，可能导致检测结果异常。

#### 【产品性能指标】

1. 准确性：检测试剂盒检测范围内准确性参考品，检测结果符合相应的基因型别。
2. 特异性：检测试剂盒检测范围外的特异性参考品，检测结果为相应基因型别；检测非人类基因组的特异性参考品，检测结果为未检出相应基因型别。



3. 检测限：检测检测限参考品（浓度5ng/μL），检测结果符合相应的基因型别。
4. 重复性：检测重复性参考品10次，结果一致且均为对应基因型别。
5. 干扰物验证：高血脂样本中甘油三酯含量在6.70mmol/L之内，黄疸样本中胆红素含量在450μmol/L之内及溶血样本中血红蛋白含量在109g/L之内，样本白蛋白含量在500mg/mL之内对检测结果没有干扰。
6. 临床研究：在三家临床单位完成1049个样本，与已批准上市的同类试剂相比，总一致率为 100.00%，95% CI：99.64%~100.00%；杂合突变一致率为100.00%，95% CI：98.87%~100.00%；纯合突变一致率为100.00%，95% CI：94.34%~100.00%；突变一致率（阳性一致率）为100.00%，95% CI：99.05%~100.00%；野生型一致率（阴性一致率）为100.00%，95% CI：99.41%~100.00%。

#### 【注意事项】

1. 本试剂盒仅适用于体外诊断检测。
2. 本试剂盒避免反复冻融，如需多次使用，请在第一次融解后分装冻存。开盖后可在25℃（湿度45%~65%）保存24小时和2℃~8℃（湿度45%~65%）保存48小时。
3. 请严格按照相关主管部门颁布的基因扩增实验室管理规范执行。
4. 实验请严格分区操作，各区物品不得交叉使用，每个区使用专用的仪器和设备。PCR试剂盒不应存放于标本制备区。

5. 试剂盒内各组分在使用前要充分溶解混匀后稍做离心。
6. 加样时应使样本加入反应液中，不应有样本黏附在管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。推荐在制备反应试剂盒添加DNA模板时，使用单独、专用的移液枪和滤芯枪头。
7. 扩增完毕后取出反应管，请勿打开反应盖，并丢弃于指定的袋子中。

#### 【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] Zhang LQ, Song X, Zhao XK, et al. Association of genotypes of rs671 within with risk for gastric cardia adenocarcinoma in the Chinese Han population in high- and low-incidence areas [J]. Cancer Biol Med, 2017, 14 (1) : 60-65.
- failure with preserved ejection fraction (HFpEF) in patients with cardiovascular diseases. [J]. Journal of Human Hypertension (2019).

#### 【基本信息】

注册人：广州凯普医药科技有限公司

住所：广州市黄埔区九龙镇中新知识城凤凰三横路71号2号试剂车间四楼

联系方式：020-34072008

售后服务单位名称：广州凯普医药科技有限公司

联系方式：020-34072008

生产地址：广东省广州市黄埔区九龙镇中新知识城凤凰三横路71号生产实验

楼3层、6层A区、601、602，2号试剂车间1至4层，仓库1层C区、2层B区、3层B

区，2号标准车间4层A区、5层A区、6层A区

生产许可证编号：粤食药监械生产许 20173077 号

**【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】**

国械注准 20233400330

**【说明书核准及修改日期】**

说明书核准日期：2023年3月15日

说明书修改日期：2023年11月07日

