

乙醇脱氢酶实时荧光 PCR SNP 分型检测试剂盒

【产品说明】

乙醇脱氢酶 ADH1B 基因的单核苷酸多态性 (SNP) (rs1229984, G>A) 会导致个体间乙醇代谢为乙醛的速度存在差异, 携带 A 等位基因的人乙醇脱氢酶活性增强, 会加速乙醇至乙醛的转化, 造成乙醛在体内的堆积, 如饮酒后乙醛产生过快, 或乙醛不能及时分解, 会表现为面红耳赤、头晕目眩、乙醛蓄积过多甚至会危及生命。本试剂盒采用 MGB 探针法实时荧光 PCR 进行乙醇脱氢酶 ADH1B 的 SNP 分型检测, 可对个体酒精代谢能力进行评估, 为合理饮酒提供科学指导。

【试剂盒组成】

组成	50 人份	贮藏条件
阴性对照 (无核酸酶水)	1 mL	-20℃
阳性对照	20 μL	
PCR 反应液	550 μL	
引物、荧光探针混合液	330 μL	
说明书	1 份	

【需要自备的器材】

1. 试剂: 核酸提取试剂。
2. 仪器: 离心机、双/四通道荧光 PCR 扩增仪、匀浆仪、-20℃冰箱、可调移液器 (2 μL、20 μL、200 μL、1000 μL)。
3. 耗材: 荧光 PCR 反应管、吸头 (10 μL、200 μL、1000 μL)。

【使用注意事项】

- 建议与源微生物提供的柱式或磁珠法核酸提取试剂盒配套使用。
- PCR 整个试验分配液区、模板提取区、扩增区; 流程顺序为配液区→模板提取区→扩增区; 严禁器材和试剂倒流。
- 所有试剂应在规定条件下储存, 冻存的试剂使用前应完全融化、混匀, 瞬时离心 15 s, 使液体全部沉于管底, 放于冰盒中, 吸取液体时移液器吸头尽量在液体表面层吸取, 使用后立即放回-20℃冻存。
- 注意防止试剂盒各组分污染。
- 严格遵守操作说明, 操作过程中移液、定时等全部过程必须精确。
- 反应体系应在特定配液区或者超净工作台中配制, 整个实验过程严格控制污染。
- 避免反复冻融试剂降低检测灵敏度, 本试剂盒应尽量在 3 次内用完。

【样品要求】

按规范采集口腔拭子 2 个, 唾液或抗凝血 2 mL。

【核酸提取】

采用离心柱法或磁珠法核酸提取试剂盒等提取样品中的核酸，低温保存、待检测。

【实时荧光 PCR 操作】

设被检样品、阴性对照和阳性对照总和为 N，则反应体系配制如下：

试剂	体系
无菌无核酸酶水	$4 \times (N+1) \mu\text{L}$
PCR 反应液	$8 \times (N+1) \mu\text{L}$
引物、荧光探针混合液	$6 \times (N+1) \mu\text{L}$

将以上配制的反应体系充分混匀后，分装每个反应管中各 $18 \mu\text{L}$ 。

分别取 $2 \mu\text{L}$ 模板 DNA，加入相应反应管中，混匀并作好标记。在荧光 PCR 扩增仪上进行以下反应：预变性 95°C 2 min，循环 95°C 10 s， 55°C 35 s，共 40 次，每次循环的第二步（ 60°C 35 s）收集荧光信号（报告基团“A 等位基因-Cy5、G 等位基因-ROX”淬灭基团都为“None”）。

【结果判定】

1. 结果分析条件设定

阈值设定原则：仪器自动生成，或者根据具体扩增曲线或仪器噪音情况进行适当调整。

2. 试验成立条件

阳性对照 Cy5 和 ROX 通道 Ct 值均 <35 且出现特异性扩增曲线，阴性对照均无 Ct 值或 Ct 值 ≥ 35 且无特异性扩增曲线，判为试验有效。试验无效时应重新进行试验。

3. 结果描述及判定

Cy5 通道和 ROX 通道被检样品 Ct 值 <35 并出现特异的扩增曲线，判为乙醇脱氢酶 A 等位基因及 G 等位基因阳性；Cy5 通道和 ROX 通道无 Ct 值且无特异的扩增曲线，判为乙醇脱氢酶 A 等位基因及 G 等位基因阴性；Cy5 通道或 ROX 通道 $35 \leq \text{Ct 值} < 40$ 并出现特异的扩增曲线，判为乙醇脱氢酶 A 等位基因或 G 等位基因疑似，对疑似样品，需重新取样提取 DNA，进行复检，Ct 值 < 40 判为阳性，否则判为阴性。

综合判定结果	检测结果		基因分型结果
	Cy5	ROX	
含有 A 和 G 等位基因	+	+	rs1229984: GA 杂合
含 A 等位基因，不含 G 等位基因	+	-	rs1229984: AA 纯合
不含 A 等位基因，含 G 等位基因	-	+	rs1229984: GG 纯合
试剂失效或者体系配制错误等	-	-	

注：“+”代表检测阳性；“-”代表检测阴性。

4. 表现型概述

ADH1B GA 杂合型或 AA 纯合型，乙醇脱氢酶突变活性增高，乙醇转化为乙醛能力过强；GG 纯合型乙醇脱氢酶活性正常，乙醇代谢能力一般。

【规格】50 人份/盒

【保存及有效期】于 -20°C 以下保存，有效期为 12 个月。