

## 乙醇及乙醛脱氢酶实时荧光 PCR SNP 分型检测试剂盒

### 【产品说明】

乙醇脱氢酶及乙醛脱氢酶为人体酒精代谢的两种关键酶，两种酶的基因分别为 ADH1B 及 ALDH2，存在单核苷酸多态性 rs1229984 (G>A) 和 rs671 (G>A)；不同等位基因的人群酒精代谢能力存在显著差异。本试剂盒采用四种荧光信号标记的 MGB 探针用于对 ADH1B 和 ALDH2 的 4 种等位基因的识别，经过对人基因组 DNA 的实时荧光 PCR 直接获取到其对应的乙醇脱氢酶 ADH1B 及乙醛脱氢酶 ALDH2 的 SNP 分型结果，根据分型结果可对不同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 (GD-003-050)	贮藏条件
阴性对照 (ddH <sub>2</sub> O)	1 mL	-20 °C 避光保存， 有效期 12 个月。
阳性对照-双杂合子 (PTC)	20 μL	
2.5×SNP 检测 PCR 反应液 (qMix)	440 μL	
2.5×ADH1B/ALDH2 SNP 检测引物、探针 Mix (引物 Mix)	440 μL	
说明书	1 份	

### 【需要自备的器材】

- 试剂：**核酸提取试剂。
- 仪器：**离心机、四通道荧光 PCR 扩增仪、-20 °C 冰箱、可调移液器 (2 μL、20 μL、200 μL、1000 μL)。
- 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；流程顺序为分配液区→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 °C 冻存。
- 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，注意防止各组间交叉污染和环境污染；防止样本间交叉污染。
- 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 0.2~2 mL。

### 【核酸提取】

采用离心柱法或磁珠法基因组 DNA 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】

- 设被检样品数量加阴性对照和阳性对照的总和为 N，在离心管中配制反应体系，具体如下：

试剂	体系加量
2.5×SNP 检测 PCR 反应液 (qMix)	8× (N+1) μL
2.5×ADH1B/ALDH2 SNP 检测引物、探针 Mix* (引物 Mix)	8× (N+1) μL
ddH <sub>2</sub> O	2× (N+1) μL

- 将上述配制的反应体系充分混匀后，在荧光扩增反应管中各分装 18  $\mu$ L。
- 取 2  $\mu$ L 样品 DNA，分别加入相应反应管中，混匀并作好标记，上机。

在荧光 PCR 扩增仪上进行以下反应：预变性 95  $^{\circ}$ C 1 min，循环 95  $^{\circ}$ C 10 s，55 $^{\circ}$ C 30 s，共 40 次，每次循环的第二步（55  $^{\circ}$ C 30 s）收集荧光信号（报告基团乙醇脱氢酶“A 等位基因-Cy5、G 等位基因-ROX”，乙醛脱氢酶“A 等位基因-VIC、G 等位基因-FAM”，淬灭基团设为“None 或 MGB”）。

【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

阳性对照四个通道 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  $\geq$ 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/或 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 等位基因和/或 G 等位基因阳性；Cy5 通道和/或 ROX 通道无 Ct 值且无特异的扩增曲线，判为乙醇脱氢酶 A 等位基因和/或 G 等位基因阴性；Cy5 通道和/或 ROX 通道 35  $\leq$  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。

VIC 通道和/或 FAM 通道被检样品 Ct 值 <35 并出现特异的扩增曲线，判为乙醛脱氢酶 A 等位基因和/或 G 等位基因阳性；VIC 通道和/或 FAM 通道无 Ct 值且无特异的扩增曲线，判为乙醛脱氢酶 A 等位基因和/或 G 等位基因阴性；VIC 通道和/或 FAM 通道 35  $\leq$  Ct 值 <40 并出现特异的扩增曲线，判为乙醛脱氢酶 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。

综合判定结果	检测结果		乙醇脱氢酶基因分型结果
	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	—	—	/
综合判定结果	检测结果		乙醛脱氢酶基因分型结果
	VIC	FAM	
含有 A 和 G 等位基因	+	+	rs671: GA 杂合
含 A 等位基因，不含 G 等位基因	+	—	rs671: AA 纯合
不含 A 等位基因，含 G 等位基因	—	+	rs671: 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。

ALDH2 GA 杂合型或 AA 纯合型，乙醛脱氢酶突变活性显著降低或几乎没有活性，乙醛代谢能力较弱，GG 纯合型乙醛脱氢酶活性正常，乙醛能正常代谢。