

# 酒精基因分型检测试剂盒

(实时荧光定量 PCR 法)

产品货号: PCDBG062

规格: 100 Reactions

## 储存条件及效期

-18℃以下保存, 有效期为 18 个月

## 试剂盒组份列表

2 x PCR 预混液:	1.25ml/管 × 2 管 (12.5μl/反应)
乙醇脱氢酶引物探针	100μl/管 × 1 管 (1μl/反应)
乙醛脱氢酶引物探针	100μl/管 × 1 管 (1μl/反应)
样本核酸释放剂	1 ml/管 × 2 管 (20μl/反应)
蒸馏水	1ml/管 × 2 管 (扩增阶段 6.5μl/反应)

使用前请先检查试剂盒中的试剂组份和数量是否与本表格内容一致

## 实验涉及设备

- DNasefree 的 tip 头, 离心管, 薄壁 PCR 管等
- 各种规格的移液器
- Realtime PCR 仪, 具体使用方法请参照相应仪器的说明书。

## 注意事项

- 为避免交叉污染, 请勿重复使用吸头或试管;
- 禁止使用不同批次的试剂盒内试剂组份;

## 样品的处理和准备

### 1. 样品采集

#### 1.1 口腔上皮细胞

用采样棒刮取口腔上皮细胞 (棉头在口腔壁转动 3 圈), 放置在取样管中, 实验时

折断取样棒棉头, 加 0.5 ml 蒸馏水, 振荡器振 5s, 取 20 μL 液体到 1.5ml 尖底离心管

中, 做好标记, 加入 20 μL 样本核酸释放剂, 振荡混匀 5 秒, 室温静置 2 分钟 (大于

2 分钟无不良影响), 加入蒸馏水 160 μL, 混匀后上清即为核酸模板。

### 1.2 发囊

1.5ml 尖底离心管加入 20 μL 的样本核酸释放剂, 放入 1-2 根带有毛囊的头发 (过  
长用无菌剪刀截断, 保证毛囊浸泡到样本核酸释放剂)。振荡器振 5s, 室温静置 2 分钟,  
加入蒸馏水 160 μL, 混匀后上清即为核酸模板。

## PCR 体系

### 酒精代谢基因分型体系

#### 1. 配制反应体系 (25ul)

##### 1.1 乙醇脱氢酶 (ADH1B), 等位基因 C/T 突变 VIC(标记 C)/FAM (标记 T)

TT (只有 FAM 有典型 S 型扩增曲线)	结论: 乙醇代谢快
TC (FAM 与 VIC 均有 S 型扩增曲线且检测 Ct 相近)	结论: 乙醇代谢快
CC (只有 VIC 有典型 S 型扩增曲线)	结论: 乙醇代谢慢

根据样本数量配制反应预混液:

组分	体积 ul	总体积 ul
2 x PCR 预混液	12.5	250
乙醇脱氢酶引物探针	1	20
蒸馏水	6.5	130
总体积	20	400

上述为 pcr 体系预混液, 总体积为实际需要测定样品数量 (加上一个阴性对照)

多加一个样, 以免分装损失不够用, (例如测定 16 个样, 加 1 个阴性对照, 总体积应

配制 18 人份为 20\*(16+1+1)=360 μL;

##### 1.2 乙醛脱氢酶 (ALDH2), 等位基因 A/G 突变 VIC(标记 A)/FAM (标记 G)

GG (只有 FAM 有典型 S 型扩增曲线)	结论: 乙醛代谢快
GA (FAM 与 VIC 均有 S 型扩增曲线且检测 Ct 相近)	结论: 乙醛代谢慢
AA (只有 VIC 有典型 S 型扩增曲线)	结论: 乙醛代谢慢

根据样本数量配制反应预混液:

组分	体积 ul	总体积 ul
2 x PCR 预混液	12.5	250
乙醛脱氢酶引物探针	1	20
蒸馏水	6.5	130
总体积	20	400

上述为 pcr 体系预混液, 总体积为实际需要测定样品数量 (加上一个阴性对照)  
多加一个样, 以免分装损失不够用, (例如测定 16 个样, 加 1 个阴性对照, 总体积应  
配制 18 人份为 20\*(16+1+1)=360 μL;

#### 2. 加入 DNA 模板

每个孔中加入 20 μL 预混液+5 μL 样品 (阴性对照为去蒸馏水)=25 μL 体系  
加入到 8 连管或 96 孔板中, 若为 8 连管则利用配套的管架固定, 96 孔板上专用封  
口膜, 用刮板先排空贴膜与板子四周的气泡, 再刮压板子, 保证啮合, 瞬间离心, 保  
证液体均一的在离心管底部 (无气泡, 无挂壁)。

#### 3. 程序运行 (具体操作程序见反面操作流程)

##### 3.1 样品放入

打开实时荧光定量 pcr 仪, 点击控制面板上的“加样槽”开启按钮, 将样品放置  
在加样槽中, 点击关闭。如果使用 96 孔板不需要支架, 如果使用 8 联管, 需使用配套  
支架。

#### 4. 结果判读

##### 4.1 举例: 选定 ADH1B 探针管观察 ADH1B 等位基因检测情况

乙醇脱氢酶 (ADH1B) 管, VIC(标记 C)/FAM (标记 T)

只有 FAM 有典型 S 型扩增曲线	TT	乙醇代谢快
FAM 与 VIC 均有 S 型扩增曲线且检测 Ct 相近	TC	乙醇代谢快
只有 VIC 有典型 S 型扩增曲线	CC	乙醇代谢慢

##### 4.2 举例: 选定 ALDH2 探针管观察 ALDH2 等位基因检测情况

乙醛脱氢酶 (ALDH2) 管, VIC(标记 A)/FAM (标记 G)

只有 FAM 有典型 S 型扩增曲线	GG	乙醛代谢快
FAM 与 VIC 均有 S 型扩增曲线且检测 Ct 相近	GA	乙醛代谢快
只有 VIC 有典型 S 型扩增曲线	AA	乙醛代谢慢

上海磐超生物科技有限公司

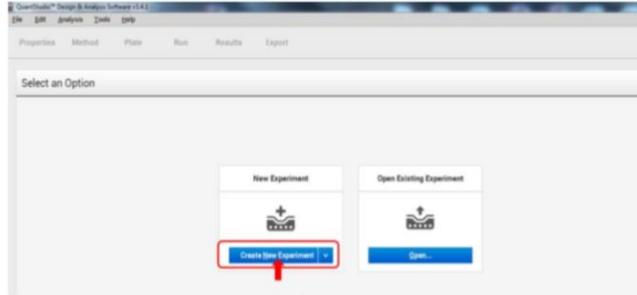
上海市闵行区沈杜公路 3872 号孵源发展 F 楼 C401 室 电话: 021-31550304

邮箱: [techsupport@pc-biotech.com](mailto:techsupport@pc-biotech.com) 网址: [www.pc-biotech.com](http://www.pc-biotech.com)

## 操作流程

双击桌面图标  , 开启QuantStudio Design & Analysis Software,

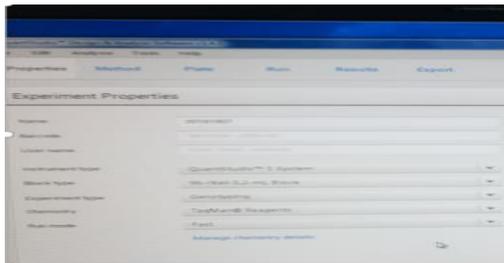
进入主界面后, 点击“Create New Experiment”。



3.在“Properties”界面设置实验属性”

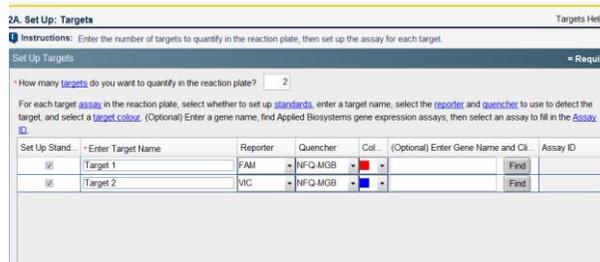
- 输入实验名称;
- 选择仪器型号;
- 选择仪器的 Block(加热模块)类型;
- 选择实验类型为 “quantitation” ;
- 选择实验试剂类型为 “taqman reagents” ;
- 选择运行模式 (run mode) 为 “standard”。

## 实操案例



- 实验名称 20190710-1
- 仪器型号: QuanStudioTM 3System
- 仪器的加热模块类型: 96 孔板-0.2mL
- 实验类型: quantitation(定量检测)
- 实验试剂类型: TaqManRReagents
- 运行模式: Standard (也可选非默认的 fast 模式)

点击 Next,出现 targets 选项, 为检测基因的 2 个等位位点, 故选择 “2”

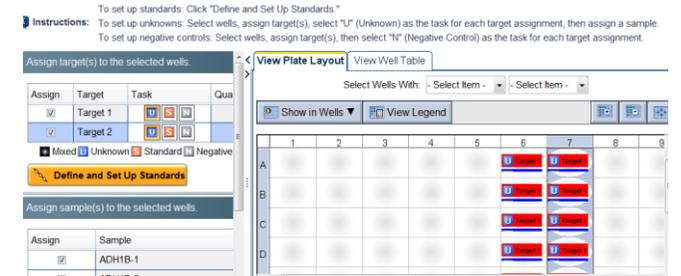
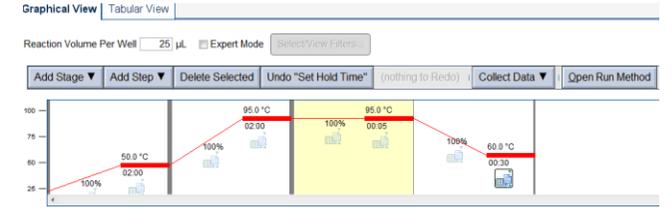


设定 PCR 程序如下:

步骤		温度	时间	循环数
1	UNG	50°C	2 分钟	1
2	预变性	95°C	2 分钟	1
3	变性	95°C	5 秒	40
	退火、延伸及检测荧光	60°C	30 秒	

步骤 3 中 60°C时荧光检测, 检测通道: FAM/VIC

扩增软件设置样本时 “sample” 对应的扩增管分别登记为 ALDH2 组、ADH1B 组, 每个样本分别有 ALDH2 检测管、ADH1B 检测管。每个检测管有 FAM 与 VIC 两个指标



如上图所示

运行结束后, 在 “Result” 中点击 “analysis”, amplification plot 中观察各管的扩增情况, 系统默认情况下给出各靶标的检测 Ct, 有数值并呈现 S 型的扩增曲线即为阳性, 无数值或呈现为一根水平直线为阴性。根据每孔的 FAM、VIC 两个结果给出每个基因的突变情况, 对应着酒精代谢能力如前所述。