

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

Man: 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

1. DNasefree 的 tip 头,离心管,薄壁 PCR 管等

2. 各种规格的移液器

3. Realtime PCR 仪,具体使用方法请参照相应仪器的说明书。

注意事项

- 1. 为避免交叉污染,请勿重复使用吸头或试管;
- 2. 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

用采样棒刮耳	Q口腔上皮细胞(椿	制头在口腔壁转	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 μ L	液体到 1.5ml 尖	底离心管

中,做好标记,加入20µL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160µL,混匀后上清即为核酸模板。

1.2 发囊

1.5mL 尖底离心管加入 20µL 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 160µL, 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,以兔分装损失不够用,(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 µ L;

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 孔板贴上专用封 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



操作流程



开启QuantStudio Design & Analysis Software,

进入主界面后,点击"Create New Experiment"。

Bolt Analysis Inc.	Lange vick 2	-	-	_	
reportes Method	Plate	Ram	Results Export		
Select an Option					
			New Experiment	Open Existing Experiment	
			*	****	
			Create Sine Experiment 👻	Que	

3.在 "Properties" 界面设置实验属性"

a.输入实验名称;

b.选择仪器型号;

c.选择仪器的 Block(加热模块)类型;

d.选择实验类型为 "quantitation";

e.选择实验试剂类型为"taqman reagents";

f.选择运行模式 (run mode) 为 "standard"。

实操案例

the second s	ACCESSION (1990)	
And Analysis Ter		
Properties Method		the Expert
Experiment Proper	ties	
	and the second s	
-		
Subset manual		
Interior Parlow	The read of the Process	
England Strength Target	Carry Systems	-
	Tangking the apprint	-
	Part.	
	Adversion of the owner of the second	
		12-

a:实验名称 20190710-1

- b: 仪器型号: QuanStudioTM 3System
- c:仪器的加热模块类型: 96 孔板-0.2mL
- d:实验类型: quantitation(定量检测)
- e:实验试剂类型: TaqManRReagents
- f: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"

Instructions:	Enter the number of targets to q	uantify in the reaction plat	e, then set up th	he assay	for each target.		
iet Up Targets							= Requ
	accer in the reaction plate rela-	ct whether to get up stand	lande onter a ta	woet nam	e select the reporter and	nuencher to u	on in deleta the
For each target target, and sele	ct a target colour. (Optional) Enter	er a gene name, find Appl	ed Biosystems	; gene ex	pression assays, then sele	ct an assay to	o fill in the <u>Assay</u>
For each target target, and sele D. Set Up Stand	*Enter Target Name	er a gene name, find Appl Reporter	ed Biosystems Quencher	gene ex	(Optional) Enter Gene Na	ect an assay to	Assay ID
For each target target, and sele D. Set Up Stand	* Enter Target Name Target 1	Reporter	Quencher	Col	(Optional) Enter Gene Na	ame and Cli	Assay ID

设定 PCR 程序如下:

步骤	2	温度	时间	循环数
1	UNG	50℃	2 分钟	1
2	预变性	95℃	2 分钟	1
2	变性	95℃	5秒	40
3	退火、延伸及检测荧光	60°C	30秒	40
步骤	3 中 60℃时荧光检测,检	剑通道:	FAM/VIC	
扩增	ቁ软件设置样本时"samp	ole"对应	Z的扩增管的	分别登记为
ALD	H2 组、ADH1B 组, 每	个样本分别	別有 ALDH	2 检测管、
AD	H1B 检测管。每个检测管存	肓 FAM 与	VIC 两个指	眎

Graphical View Tabular View Reaction Volume Per Wel 25 µL Expert Mode Add Stage ▼ Add Stage ▼ Delete Selected Undo "Set Hold Time" (nothing to Redo) Collect Data ▼ Open Run Method </tabular >

To set up standards: Click "Define and Set Up Standards."

tructions: To set up unknowns: Select wells, assign target(s), select "U" (Unknown) as the task for each target assignment, then assign a sample. To set up negative controls: Select wells, assign target(s), then select "N" (Negative Control) as the task for each target assignment.

				^<	Vie	w Plate I	_ayout ∨	iew Well Ta	able						
ssinn Tarnet Task Qua				>	Select Wells With: - Select Item Select Item										
V	Target 1		GUU	Ш	0	Show i	n Wells 🔻	View	/ Legend						***
V	Target 2											-		_	_
Mixed ۱۱ Unknown Standard ۱۱ Negative کلی Define and Set Up Standards					A	2		3	4	5	U Target 1	U Target 1	0		
ssign sa	mple(s) to th	ne selected wells	i	-	c						U Target 1	U Tarpet 1			
Assign	Samp	le			-							\geq			
	ADH1	B-1			D						U Target 1	U Target 1			
-	1011					-									

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。