

Version 1

Code No. AG12801

# *GenDiff* SNP 预混型探针法 qPCR 试剂盒 (适用于 ALDH2 基因分型)

## *GenDiff* SNP Premix Probe qPCR Kit for ALDH2 Genotyping

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



## ➤ 产品概述

饮酒后体内的乙醇在肝脏中由乙醇脱氢酶（ADH）氧化为乙醛，乙醛作为底物进一步在乙醛脱氢酶 2（ALDH2）催化下转变为无害的乙酸；ALDH2 是人体酒精代谢的关键酶，ALDH2 基因中有一个常见单核苷酸多态性（SNP）位点（rs671），ALDH2 基因突变会降低人体对乙醛的解毒能力，同时可能增加癌症等疾病发生的风险。因此 ALDH2 基因的 SNP 检测可通过检验 ALDH2 突变类型（野生型、杂合型、突变型），分析酒精代谢能力，指导个性化饮酒，预防疾病发生。

本产品是基于 TaqMan MGB 方法专门针对 ALDH2 基因研发的试剂盒，试剂盒中 12.5X *GenDiff* SNP Primer & Probe Mix for ALDH2 Genotyping 包含两种不同荧光的探针，分别为 FAM 标记与 VIC 标记，FAM 荧光通道用于检测野生型（G 型），VIC 荧光通道用于检测突变型（A 型），搭配试剂盒中 2X *GenDiff* SNP qPCR Mix for ALDH2 Genotyping 和 Lysis Buffer 使用；本产品操作简单，只需通过刮取口腔上皮细胞到 Lysis Buffer 中简单裂解后进行定量扩增，观察两种荧光探针的有无即可获得基因分型结果。本产品具有操作简便、灵敏度高、重复性高、抗干扰性强等特征。

## ➤ 产品组成

组分名称	AG12801 ( 50 rxns / 25 μl )
2X <i>GenDiff</i> SNP qPCR Mix for ALDH2 Genotyping	625 μl
12.5X <i>GenDiff</i> SNP Primer & Probe Mix for ALDH2 Genotyping <sup>*1</sup>	100 μl
Lysis Buffer <sup>*2</sup>	1 ml x 5 pcs
RNase free water	1 ml

\*1: 该试剂中包含引物探针，需避光保存，其中 FAM 标记 G 型，VIC 标记 A 型。

\*2: 该试剂为裂解液，开启后可置于室温保存。

## ➤ 保存及运输

保存温度：-20℃保存

运输温度：干冰运输或者-20℃冰袋运输

## ➤ 产品优势

1. 本产品操作简单，口腔上皮细胞取样后可直接进行定量扩增，通过观察两种荧光信号的有无即可判定结果，具有操作简便、分析简单、结果可靠等优点。
2. 本产品具有高灵敏度、高区分度、高重复性、抗干扰性强等特征。

➤ 实验原理

TaqMan MGB 探针检测 SNP 原理

TaqMan MGB 探针在 TaqMan 探针的 3' 端连接小沟结合物 (Minor Groove Binder, MGB)，提高探针的 T<sub>m</sub> 值，因此 TaqMan MGB 探针的序列会短于普通探针，可增加杂交反应的特异性及降低荧光背景，TaqMan MGB 探针如下图 1 所示：



图 1. TaqMan MGB 探针

TaqMan MGB 探针检测所用的探针在 5' 端标记有荧光物质 (如: FAM)，3' 端标记有淬灭物质 (如: BHQ)，当探针保持完整时，5' 端荧光基团发射的荧光受 3' 端淬灭基团淬灭，不能发出荧光信号；而当探针被分解后，5' 端荧光基团与 3' 端淬灭基团分离，释放荧光信号。

TaqMan MGB 探针在 SNP 检测时，在 SNP 位点处设计两条不同的探针，一条与野生型等位基因互补，另一条与突变等位基因互补。当 TaqMan MGB 探针与模板完全互补配对，在延伸时会被 Taq DNA 聚合酶的 5' → 3' 外切酶切割产生荧光 (如图 2A 所示)；如有一个碱基不匹配，TaqMan MGB 探针与模板不结合，在延伸时不被切割而无荧光信号值 (如图 2B 所示)。通过此方法达到区分不同基因型的目的。

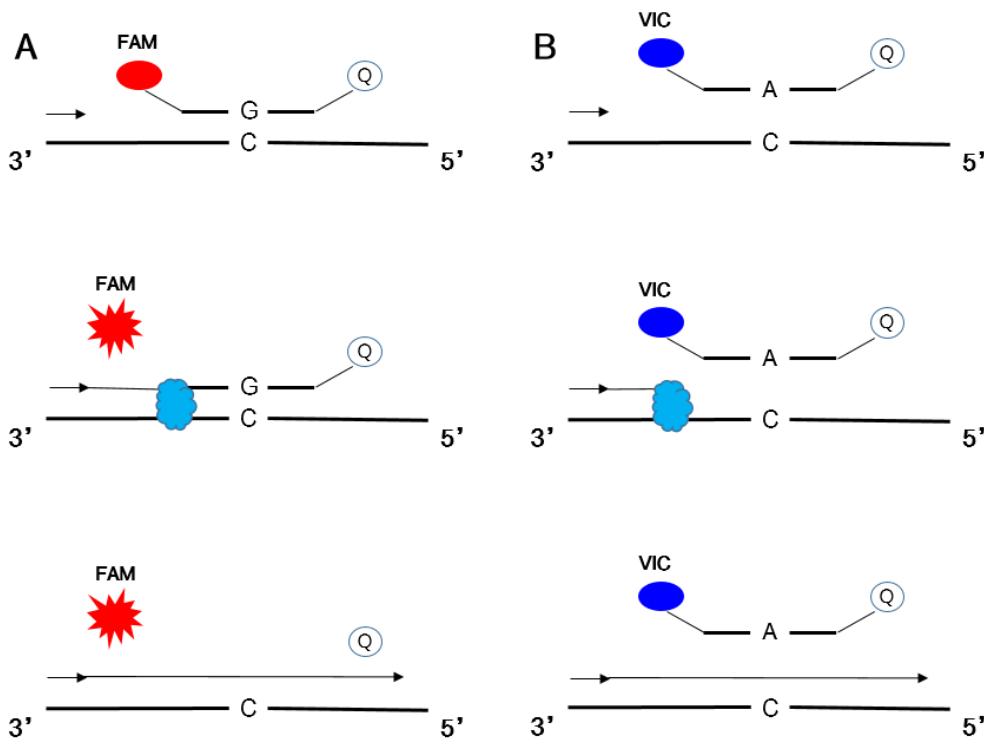


图 2. TaqMan 探针法检测 SNP 分型原理

## ➤ 使用前注意事项

1. 请保持实验区域洁净，实验所用的离心管、枪头等耗材均需 RNase-free 级别，以避免 RNase 污染。
2. 请仔细阅读所用定量 PCR 仪器设备操作手册，根据仪器操作手册进行操作。
3. 需要同时检测几个样本时，可先将各组分溶液配制成预混液，然后分装到每个反应管中。
4. 所有反应预混液建议在冰上进行配制。

## ➤ 实验前准备

### 1. 试剂 & 耗材：

1.5 ml 离心管（RNase-free）、定量 PCR 管（RNase-free）、枪头、冰盒。

### 2. 仪器：

定量 PCR 仪、移液器、旋涡振荡仪、小型桌面离心机。

## ➤ 操作步骤

### 1. 模板制备

取 100  $\mu$ l Lysis Buffer 到 1.5ml 离心管（RNase-free）中，使用无菌棉签刮取口腔上皮细胞（在口腔上壁来回刮取 10-20 次左右），将棉签伸入 Lysis Buffer 中旋转 5-10 次搅拌充分，并按压棉签使液体尽量留在离心管内。

### 2. 按照下表配制 PCR 反应液：

组分名称	反应终浓度	25 $\mu$ l 体系
2X <i>GenDiff</i> SNP qPCR Mix for ALDH2 Genotyping	2X	12.5 $\mu$ l
Template <sup>*1</sup>	-	2 $\mu$ l <sup>*1</sup>
12.5X <i>GenDiff</i> SNP Primer & Probe Mix for ALDH2 Genotyping	12.5X	2 $\mu$ l
RNase free water	-	8.5 $\mu$ l

\*1: 使用步骤 1. 模板制备中获取的模板，2  $\mu$ l / rxn。

### 3. qPCR 反应条件

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	5 min	1
变性	95°C	15 sec	} 40-45
退火和延伸 <sup>*1</sup>	63°C	90 sec	

\*1: 此步骤进行荧光信号采集。

## ➤ 实验例

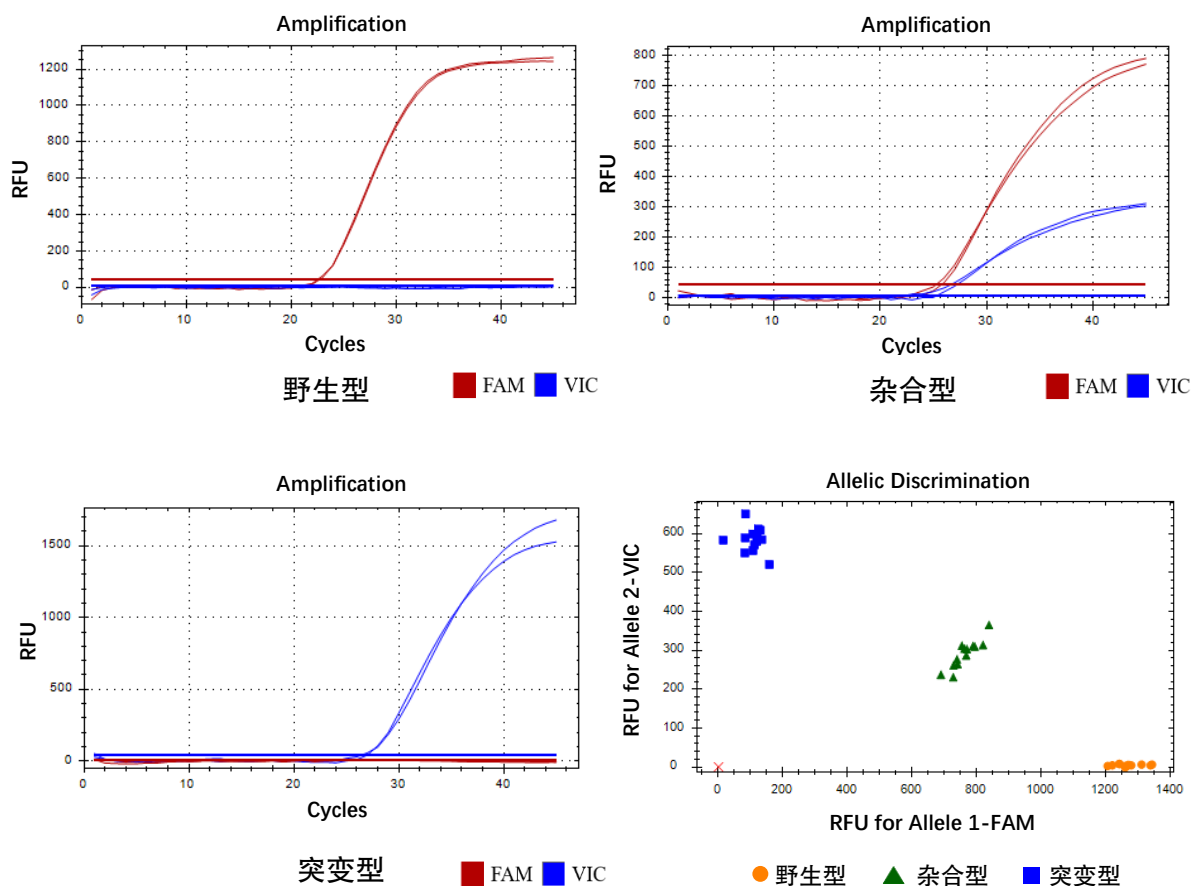
1、对不同人群进行口腔上皮细胞取样，使用本产品进行不同基因型检测，所用定量仪器：Bio-Rad CFX96，判定标准及示例图如下：

1) 判定标准<sup>\*1</sup>：

	野生型	杂合型	突变型
野生基因 G (FAM)	+	+	-
突变基因 A (VIC)	-	+	+
酒精耐受度	强	一般	弱

\*1：“+”代表有明显扩增曲线；“-”代表无明显扩增曲线；

2) 基因分型示例图：



结果如上图所示：

- 1) 只有 FAM 荧光检出的为野生型，酒精耐受度较强；
- 2) FAM 和 VIC 荧光均能检出的为杂合型，酒精耐受度一般；
- 3) 只有 VIC 荧光检出的为突变型，酒精耐受度较弱。

## ➤ 产品注意事项

### 1. 模板获取

- ❖ 取样前应提前将 Lysis Buffer 取至 1.5ml tube 中备用，吸取试剂过程中应注意避免产生大量气泡；
- ❖ 取样前可先用清水漱口，去除口腔内杂物以免影响模板获取；
- ❖ 对口腔上皮细胞采样的力度和采样的时间会影响到模板的获取，口腔上皮细胞主要分布在口腔两侧颊部，在口腔两侧颊部刮取为好；稍用力(相当于刷牙的力气)按前后上下方向在口腔粘膜上刮 10-20 次；
- ❖ 采样后棉签浸入裂解液中旋转 5-10 次，保证获取模板更充分；
- ❖ 搅拌后充分按压棉签使液体尽量留在离心管内，避免棉签吸取过多裂解液导致获取的模板过少；
- ❖ 若扩增结果异常，应重新采样并进行检测。

### 2. 实验细节

- ❖ 添加样本时，尽量避免样本间的错误交叉及样本污染；
- ❖ 扩增反应前要确认管内无气泡；
- ❖ 检查反应程序，确保反应程序设置正确；
- ❖ 实验过程中应穿戴好实验服，佩戴好一次性的口罩、手套。