

人类 MTHFR 基因检测试剂盒（PCR-荧光探针法） 说明书

【产品名称】

人类 MTHFR 基因检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

20 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒适用于定性检测人类 EDTA、柠檬酸盐抗凝新鲜静脉全血样本 DNA 中 MTHFR 基因 677C>T 位点的多态性。

本试剂盒仅用于临床辅助诊断，检测结果可辅助指导叶酸的个体化服用。具体临床应用时，临床医生需结合病例的实际情况进行判断，不能以本试剂盒检测结果作为临床诊断的唯一依据。

叶酸（Folic Acid）是指具有相关生物活性的一类同效水溶性 B 族维生素，其在机体内的活性形式为 5-甲基四氢叶酸，为细胞生长和繁殖的必需物质，参与体内很多重要的代谢反应。作为体内一碳单位的传递体，叶酸参与嘌呤、胸腺嘧啶、核苷酸等多种物质的合成和转化，同时影响磷脂、肌酸、神经介质的生成，促进神经细胞与脑细胞发育，叶酸缺乏会导致高同型半胱氨酸血症^[1-7]。

5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)能催化 5,10-亚甲基四氢叶酸产生 5-甲基四氢叶酸，参与甲基传递与核苷酸合成，是叶酸代谢过程中的关键酶。其基因位点突变对酶的活性和热稳定性产生影响，从而影响叶酸和甲硫氨酸代谢^[4,7]。该基因最常见的单核苷酸多态性为 677C>T，在中国发生率为 45.2%^[7]。MTHFR 677C>T 突变可造成其编码的氨基酸由丙氨酸变成缬氨酸，引起耐热性和酶活性下降，杂合 MTHFR 677CT 酶活性下降 30%，纯合 677TT 酶活性下降 65%以上，在低叶酸的环境下，纯合 677TT 可显著升高血浆同型半胱氨酸浓度，从而引起静脉栓塞、肺栓塞、动脉粥样硬化、脑卒中等疾病，携带 MTHFR 677TT 基因型的母亲在低叶酸环境情况下生育神经管缺陷的患儿的风险也大大增加^[3-7]。

本试剂盒针对人类 MTHFR 基因 677C>T 位点的多态性进行定性检测（见表 1），MTHFR 基因 677C>T 位点的多态性与叶酸代谢的相关性主要来自国内外文献报道，并得到临床治疗的普遍认可。本产品尚未与具体药物联合进行临床试验，仅针对靶基因突变的检测性能进行了临床验证。

表 1：本试剂盒检测 MTHFR 基因多态性类型

基因	基因多态性	碱基	检测通道
MTHFR	677C	GCC	FAM
	677T	GTC	VIC

【检验原理】

本试剂盒针对人类 MTHFR 基因的不同多态性位点，设计 1 套特异性引物和探针组合，一个反应体系中通过两种不同通道检测一个位点的基因多态性。在反应体系中含有不同基因型模板的情况下，PCR 反应得以进行并释放不同的荧光信号。利用仪器对 PCR 过程中相应通道的信号强度进行实时监测和输出，实现检测结果的定性分析。

【主要组成成分】

试剂盒采用 PCR 反应预混液设计，装有 MTHFR 基因检测试剂。试剂盒主要由 MTHFR 677 反应液、阳性对照和空白对照组成。本试剂盒未包括商业化血液基因组 DNA 提取试剂盒（天根生化科技（北京）有限公司，货号 DP318 或 DP348）、8 联 PCR 管（规格 0.1mL，厂家 BIOplastic，货号 B72719、B57801；规格 0.2mL，厂家 生工生物工程(上海)股份有限公司，货号 F602003）或 96 孔 PCR 板（规格 0.1mL，厂家 BIOplastic，货号 B17489；规格 0.2mL，厂家 ABI，货号 4316813）等实验所需试剂及耗材。

试剂盒 PCR 反应液中包含 PCR 缓冲液、dNTPs、特异性引物和探针、内标引物、探针、Taq 酶、UNG 酶，具体组成见表 2。

表 2：试剂盒组成

管号	标签名称	主要组成成分	装量规格 (20 人份/盒)
1	MTHFR 677 反应液	PCR 缓冲液、dNTPs、特异性引物和探针、内标引物和探针、Taq 酶、UNG 酶	1 管（480μL）
2	阳性对照	MTHFR 677C 和 MTHFR 677T 的质粒混合液	1 管（200μL）

3	空白对照	Tris-HCl 缓冲液(10mM)	1 管（200μL）
---	------	--------------------	------------

【储存条件及有效期】

- 20±5℃ 避光保存，有效期 9 个月。
- 试剂盒在使用时应尽量减少试剂冻融次数，并保证不多于 6 次冻融。
- 生产日期及有效期至：见标签。

【适用仪器】

- 本试剂盒适用于 Stratagene MX3000P、AB 7500、LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪。
- 本试剂盒要求仪器使用 FAM、VIC 通道采集不同多态性的 MTHFR 基因扩增荧光信号，使用 ROX 通道采集内标基因扩增荧光信号。

【样本要求】

本试剂盒适用于从 2 mL EDTA、柠檬酸盐抗凝新鲜静脉全血中提取的人类基因组 DNA 的检测。要求 DNA 的 A260/A280 在 1.6~2.0 之间，DNA 样本-20℃ 以下保存不多于两年，冻融次数不超过 6 次。

【检验方法】

- 试剂准备：（试剂准备区）
 - 从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温，各组充分融解，快速离心 10 秒。
 - 核算当次实验所需要的反应数（n），按照 23μL/孔分装量将反应液分装到 n 个反应管内。PCR 反应管转移至样本准备区，剩余试剂放回-20℃±5℃冰箱冷冻避光保存。

$$n = \text{样本数} + \text{空白对照 (1T)} + \text{阳性对照 (1T)}$$

- 样本准备：（样本准备区）

- 样本 DNA 提取：参考所购买的商用基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行操作。推荐使用天根生化科技（北京）有限公司血液基因组提取试剂盒（TIANamp Blood DNA Kit，DP318 或 DP348）用于血液基因组 DNA 的提取。
- 加样：
 - 将待测样本的基因组 DNA、阳性对照、空白对照，分别加入已装有 PCR 反应液的反应管中，加入量为 2μL/孔。待测样本的基因组 DNA 推荐浓度为 5-15ng/μL。
 - 盖好 PCR 反应管盖，记录样本加样情况。将 PCR 反应管转移到核酸扩增区进行上机检测。若 PCR 反应管内加入模板后遇阻时情况不能立即上机，建议将加好模板的 PCR 反应管放于 2~8℃条件暂时保存，并在 24 小时内尽快上机检测。
- PCR 扩增：（核酸扩增区）
 - 开机，并进行仪器性能自检。
 - 取样本准备区准备好的 PCR 反应管，放置在仪器样品槽相应位置。并记录放置顺序。
 - 按表 3 设置仪器扩增相关参数，并开始进行 PCR 扩增。反应结束后，根据扩增曲线，划定合适基线（一般起始设定为 3，终止设定为 15）和荧光阈值（一般将阈值划定在扩增曲线对数形式下指数增长期的中间），得到不同通道 Ct 值并按照表 4 进行结果判定。

表 3：仪器扩增相关参数

体系	总体积为 25μL		
	信号采集	MTHFR 677C—FAM 通道采集荧光信号	
PCR 反应条件	反应液	MTHFR 677T—VIC 通道采集荧光信号	
	内标系统	内标基因—ROX 通道采集荧光信号	
	阶段	条件	循环数
	UNG 处理	37℃：10 分钟（min）	1
	预变性	95℃：5 分钟（min）	1
PCR	PCR	95℃：15 秒（s）	40
		60℃：60 秒（s） （设置在此阶段结束时采集荧光信号）	

【检验结果的解释】

1. 试剂盒有效性判定：

- 阳性对照：FAM、VIC、ROX 通道 Ct 值 ≤ 32 ，扩增曲线有明显指数增长期。
- 空白对照：FAM、VIC、ROX 通道无扩增曲线，或者扩增曲线为直线或轻微斜线，无明显指数增长期，无 Ct 值或 Ct 值 ≥ 38 。

2. 样本有效性的判定：

- 内标基因：所有样本检测中 ROX 通道 Ct 值 < 38 ，扩增曲线有明显指数增长期。

3. 检测结果的判定：

按照下表 4 对样本检测结果进行判定，确定样本基因多态性。

表 4：结果判定

反应液	基因多态性	FAM 通道	VIC 通道
MTHFR 677 反应液	MTHFR 677C/C 纯合野生	Ct 值 ≤ 36	Ct 值 > 36 或无 Ct 值
	MTHFR 677C/T 杂合突变	Ct 值 ≤ 36	Ct 值 ≤ 36
	MTHFR 677T/T 纯合突变	Ct 值 > 36 或无 Ct 值	Ct 值 ≤ 36

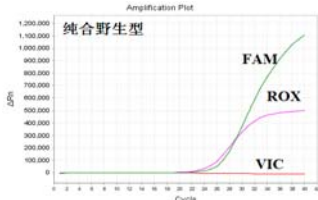


图 1 纯合野生型样本检测示意图

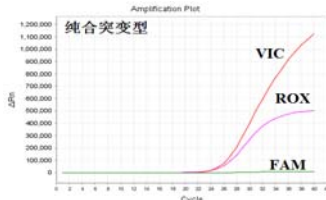


图 2 纯合突变型样本检测示意图

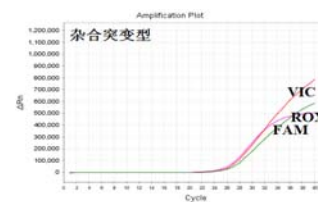


图 3 杂合突变型样本检测示意图

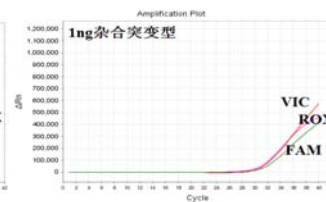


图 4 1ng 杂合突变型样本检测示意图

【检验方法的局限性】

- 样本检测结果与样本的收集、处理和保存过程有关，其中任何失误都将导致检测结果的不准确。如果样本处理时未控制好 DNA 的质量，可能出现假阴性的结果。
- 本试剂盒检测结果仅供临床参考，用于指导个体化用药，不得作为临床诊治的唯一依据。对患者应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
- 本试剂盒仅限于从 EDTA、柠檬酸盐抗凝新鲜静脉全血中提取的人类基因组 DNA 的检测；检测系统仅适用于 Stratagene MX3000P、AB 7500、LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪；使用商业化血液基因组 DNA 提取试剂盒（推荐使用天根生化科技（北京）有限公司的血液基因组 DNA 提取试剂盒系列，如 DP318、DP348）进行血液样本基因组 DNA 提取；样本检测应严格按照说明书要求操作。
- 当检测结果为野生型时，不排除被检测者带有 MTHFR 基因其他基因位点突变类型。

【产品性能指标】

- 试剂盒包装完整，无内容物溢出；标签外观完整，无脱落，标签标识内容清晰；试剂盒内组成正确，无重复、缺失组分的情况。
- 使用试剂盒反应液检测 MTHFR 基因突变型参考品，应检测出对应突变。
- 使用试剂盒反应液检测 MTHFR 基因野生型参考品，应不得检出突变。
- 试剂盒检测限可达到：200 copies/ μ L 样本中能准确检测出对应基因型。
- 使用试剂盒重复检测对应基因型参考品 10 次，应检出对应基因型，且检测结果 Ct 值变异系数 CV $\leq 5\%$ 。

【注意事项】

- 本试剂盒仅供体外诊断使用。
- 不同批号试剂不能混用。
- 本试剂盒内阳性对照不具有传染性，但在使用时建议将其视为具有潜在传染性物质进行处理。

行处理。

- 本试剂盒内用剩的试剂及实验过程中的废弃物建议按照医疗废弃物进行处理。

【标识的解释】

符号	意义
IVD	体外诊断医疗器械

【参考文献】

- Greene N D, Stanier P, and Copp A J. Genetics of human neural tube defects. Hum Mol Genet, 2009. 18(R2):R113-29.
- Ouyang S, Li Y, Liu Z, et al. Association between MTR A2756G and MTRR A66G polymorphisms and maternal risk for neural tube defects: a meta-analysis. Gene, 2013. 515(2):308-12.
- Wang X M, Wu H Y, and Qiu X J. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T polymorphism and risk of preeclampsia: an updated meta-analysis based on 51 studies. Arch Med Res, 2013. 44(3):159-68.
- Botto LD, Yang Q: 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. Am J Epidemiol. 2000;151(9): 862-77.
- Trabetti E. Homocysteine, MTHFR gene polymorphisms, and cardio-cerebrovascular risk. J Appl Genet. 2008; 49(3):267-82.
- Holmes MV, Newcombe P, and Hubacek JA et al: Effect modification by population dietary folate on the association between MTHFR genotype, homocysteine, and stroke risk: a meta-analysis of genetic studies and randomized trials. The Lancet 2011; 378:584-594.
- Yang BY, Liu YY, et al. Geographical Distribution of MTHFR C677T, A1298C and MTRR A66G Gene Polymorphisms in China: Findings from 15357 Adults of Han Nationality. PLoS ONE 8(3):e57917.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：武汉友芝友医疗科技股份有限公司

住 所：武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号武汉光谷国际生物医药企业加速器 1.2 期 23 栋 1 单元 4、5 层

联系方式：027-65330996

售后服务单位：武汉友芝友医疗科技股份有限公司

联系方式：027-65330996

生产地址：武汉市东湖新技术开发区高新大道 858 号生物医药园加速器一期 A4 栋西侧 1 楼

医疗器械生产企业许可证编号：鄂食药监械生产许 20120580 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准 20173401322

【说明书核准及修改日期】

2022 年 7 月 19 日