

MTHFR 基因检测试剂盒 (PCR-荧光探针法)

说明书

【产品名称】

MTHFR 基因检测试剂盒 (PCR-荧光探针法)

【包装规格】

24 人份 / 盒

【预期用途】

用于体外定性检测全血样本中 MTHFR 基因 677 位点 C>T 的多态性。

研究证实, 高 HCY 水平以及 MTHFR 677 基因型, 均是冠心病重要的独立危险因素。2016 年发布的《H 型高血压诊断与治疗专家共识》明确指出: “MTHFR 677TT 基因型是冠心病与脑卒中的独立危险因素, 有条件的单位应该进行基因型检测, 以帮助对患者进行危险分层。”

【检测原理】

Taqman-ARMS 探针技术基于实时荧光定量 PCR 平台, 结合 ARMS 特异性富集和 Taqman 探针特异性荧光检测两种技术对基因多态性进行检测。本产品选取人类基因组中 MTHFR 基因序列, 在 MTHFR (C677T) SNP 位点设计 ARMS 引物结合探针进行 PCR 扩增, 利用 ARMS 引物对靶基因序列进行特异性 PCR 扩增, Taqman 探针针对扩增产物进行特异性检测, 通过监测整个 PCR 过程荧光信号的变化, 对待测模板进行定性分析。

PCR 检测使用尿苷酶(UDG)防污染体系, 经加热可以选择性地降解含 U 碱基的核酸片段, 以防止先前 PCR 扩增产物的污染。

同时本产品采用内标质控体系, 用于监测反应体系可能存在的抑制因素。内标模板与靶基因无同源性, 内标探针选择的是与靶基因探针通道 (FAM 通道) 无冲突的另一检测通道 (HEX/VIC 通道)。

【主要组成成分】

表 1 试剂盒主要组成成分

序号	产品组成	主要成分	规格及装量
1	MTHFR PCR 反应液 P	Taq 酶、UDG 酶、dNTP、Mg ²⁺	600μL×1 管
2	MTHFR677 引物探针混合液 C	引物、探针	204μL×1 管
3	MTHFR677 引物探针混合液 T	引物、探针	204μL×1 管
4	MTHFR677 阳性质控品 1	MTHFR677 CC 型灭活标本 DNA	40μL×1 管
5	MTHFR677 阳性质控品 2	MTHFR677 CT 型灭活标本 DNA	40μL×1 管
6	MTHFR677 阳性质控品 3	MTHFR677 TT 型灭活标本 DNA	40μL×1 管
7	MTHFR 内标质控品	内标质粒	80μL
8	MTHFR 阴性质控品	纯水	800μL

注 1: 不同批次之间同一组分不可以相互替换。

注 2: 试剂盒以外必需的设备及耗材: 荧光定量 PCR 仪、核酸提取试剂、干式恒温仪、旋涡混合器、生物安全柜、移液器及吸头、离心管、高速离心机、微型离心机、PCR 反应管、无粉乳胶手套、一次性口罩。

【储存条件及有效期】

于-20℃±5℃避光保存, 有效期为 6 个月。

产品效期详见外包装。开瓶后冻融次数及稳定性要求: 开瓶后稳定保存不超过 3 个月, 反复冻融次数不超过 3 次。

【适用仪器】

荧光定量 PCR 仪器: 适用于 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪、Bio-Rad CFX-96 型荧光定量 PCR 仪、罗氏 Cobas z480 型荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

1. 检测样本类型: 抗凝全血标本。
2. 样本采集: 从受检者手臂弯曲处或手背处抽取静脉血 3~5mL, 置于 EDTA

抗凝管(紫盖)内, 轻轻颠倒混匀。

3. 样本保存: 在 2~8℃条件下保存不超过一周, -20℃±5℃条件下保存不超过 6 个月。

4. 运输: 密封冷冻运输, 避免解冻和漏液。

【检验方法】

1. 样本处理

1.1 样本处理和核酸提取

本试剂盒不包含核酸提取成分, 样本、阴性质控品处理采用商品化的核酸提取试剂盒, 其中阴性质控品(180μL)提取时需要加入内标质控品(20μL), 推荐使用天根生化科技(北京)有限公司核酸提取或纯化试剂(体外诊断试剂备案号: 京海械备 20150135), 具体操作参见该试剂盒说明书, 但要注意以下事项。

- 1) 提取 DNA 需要测定浓度, 并满足 OD260/OD280=1.6~2.0;
- 2) 推荐 DNA 上样量 40~120ng;
- 3) 提取完的 DNA 建议立即进行检测, 否则请于-20℃±5℃保存。

1.2 准备

实验开始前取出试剂盒内阴性质控品和内标质控品, 充分解冻。使用前持续振荡 15s 混匀, 瞬时离心 10s, 准备相应数量的 PCR 仪样品反应管,

2. PCR 试剂配制及加样

检测反应设置阴性质控和阳性质控。

2.1 提前 30min 将于冷冻保存的试剂取出, 室温解冻, 使用前振荡 15s, 瞬时离心 10s。

2.2 确定反应数: N=待检样本数(n)+MTHFR677 阳性质控品数(3)+MTHFR 阴性质控品数(1)+1, 计算如下表:

表 2 体系配制

试剂	引物探针混合液 (μL)	PCR 反应液 (μL)
A	MTHFR677 引物探针混合液 C 8.5×N	MTHFR PCR 反应液 P 12.5×N
B	MTHFR677 引物探针混合液 T 8.5×N	MTHFR PCR 反应液 P 12.5×N

2.3 取离心管配置反应体系, 试剂全部加入后振荡 15s, 瞬时离心 10s。

2.4 将上述混合液 21μL/管分装至 PCR 反应管中备用。

2.5 加样: 分别取阳性质控品、提取后阴性质控品和待测样本的 DNA 提取液各 4μL 分别加入对应的 PCR 反应管中, 盖紧管盖, 瞬时离心 10s 将管壁上的液体全部甩至管底, 如有气泡, 轻弹、离心直至气泡去除, 然后立即进行 PCR 反应。推荐样本摆放位置如下表 3:

表 3 推荐样本摆放位置

名称	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MTHFR677(C)	①	②	③	④	⑤	⑥	STD1	STD2	STD3	NTC
MTHFR677(T)	①	②	③	④	⑤	⑥	STD1	STD2	STD3	NTC

注: ①~⑥代表样本; STD1-3 分别代表 MTHFR677 阳性质控品 1-3, NTC 代表阴性质控品。

3. PCR 扩增程序设置

3.1 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪 (Version 2.3)

1) 面板设置: 双击“7500 System Software”图标打开软件, 单击“Advanced Setup”, 进入“Experiment Properties”界面, 对实验进行命名。选择机型为 7500 (96 Wells), 选择实验类型为“Quantitation-Standard Curve”, 选择荧光收集方式为“TaqMan® Reagents”。选择反应时长, 单击“Plate Setup”进入“Define Targets and Samples”编辑界面: 在“Define Targets”对话框内, 根据需要单击“Add New Target”可添加多个 Targets, 在“Target name”中输入相应的编号名称, 将“Reporter”改为“FAM”及“VIC”, 将“Quencher”

改为“None”; 在“Define Samples”对话框内, 根据需要单击“Add New Sample”可添加多个 Samples, 在“Sample name”中输入相应编号名称。单击打开“Assign Targets and Samples”编辑界面: 在“View Plate Layout”界面选中样本所放的孔位, 确认与仪器相对应; 在“Assign Target(s) to the selected wells”对话框中, 将对应的 Target 划“√”; 在“Assign Sample(s) to the selected wells”对话框中, 将对应的 Sample 划“√”; 在“Select the dye to use as the passive reference”对话框界面中选择“(none)”。

2) 反应条件设置: 单击“Run Method”进入反应条件设置面板, 编辑所用扩增程序(见表 4), 并在“Reaction Volume Per Well”内输入“25”; 单击“Add Stage”可以选择“Holding”或者“Cycling”, 其中“Holding”为添加一个温度步骤, “Cycling”为添加一个可循环的若干温度步骤; 单击“Add Step”可以选择“Before”或者“After”, 即可在一个 Stage 的前或后添加一个 step; 在“Number of Cycles”可以更改为相应的循环数。确认无误后, 单击“Start”后将结果保存, 即可开始扩增检测。

3.2 Bio-Rad CFX-96 型荧光定量 PCR 仪

1) 面板设置: 双击“Bio-Rad CFX Manager”图标打开软件, 单击“Prime PCR”, 选择“Probe”进入设置界面: 单击“Plate”下的“Create New”进入面板编辑, 单击“Scan Made”下拉框选择“All Channels”, 单击“Select Fluorophores”下拉框勾选“FAM”及“HEX”, 在“Sample Type”下拉框选择所选反应孔的检测样本类型, 包括“Unknown”(待测样本)、“Positive Control”(阳性对照)、“Negative Control”(阴性对照), 选中反应孔在“FAM”及“HEX”处打勾, 根据实验需要可在“Target Name”中输入扩增基因名称, 在“Sample Name”输入所选检测孔的样品名, 并打勾确认。设置结束后单击“OK”。

2) 反应条件设置: 单击“Protocol”下的“Create New”进入设置界面, 需编辑反应体系及扩增程序(见表 4), 在图形或文本模式下可以直接对温度和保持时间进行编辑。单击“Insert Step”在程序中增加一个温度步骤, 单击“Delete Step”在程序中删除选中步骤, 单击 Add Plate Read To Step, 在程序中指定获取荧光数据的时间。单击“GOTO”步骤的重复次数, 改变程序中的循环次数, 单击“GOTO”步骤数可改变 GOTO 循环中所包含的步骤。设置完成后, 单击“Start Run”后, 选择文件保存的位置并编辑文件名后, 即可进行扩增检测。

3.3 罗氏 Cobas z480 型荧光定量 PCR 仪

1) 面板设置: 在“User Defined Workflow”操作系统, 双击“LightCycler® 480 SW UDF 2.0.0”图标打开软件, 输入用户名和密码登录后进入软件主界面, 单击“New Experiment”进入程序设定界面。单击“Experiment”, 在“Detection Format”下拉菜单选择“Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe”。单击“Sample Editor”, 在 Step1 中选择“Abs Quant”(绝对定量); 在 Step2 中选择对应的样本反应孔, 在右侧编辑栏中分别对每个反应孔进行编辑: 在“Sample Name”编辑样本名称, “Quantification Sample Type”选择样本类型“Unknown”(待测样本)、“Positive Control/Calibrator”(阳性对照)、“Negative Control”(阴性对照)。

2) 反应条件设置: 单击“Experiment”, 在“Reaction Volume”输入反应体系大小。按照所需 PCR 反应条件进行编辑(见表 4): 在“Program Name”添加反应步骤, 并选择“Cycles”(循环数)和“Analysis Mode”; 单击每个“Program”对各步骤的反应温度及时间进行编辑。在荧光信号采集阶段, Analysis Mode 下拉菜单中选择 Quantification, Acquisition Mode 下拉菜单中选择 Single。设置完成后, 单击“Start Run”选择保存位置并编辑文件名称, 即可进行扩增检测。

表 4 PCR 扩增程序

序号	阶段	温度	时间	循环数
1	UDG 酶反应	37℃	2min	1
2	预变性	95℃	3min	1
3	变性	94℃	15s	10
4	退火	62℃	20s	
5	延伸	72℃	30s	
6	变性	94℃	15s	
7	退火	60℃	20s	30
8	退火, 延伸, 荧光信号采集 (FAM, VIC/HEX)	72℃	30s	
9	仪器冷却	25℃	1min	

4. PCR 结果分析条件设定

反应结束后,使用 PCR 仪配套软件对本次试验结果进行分析,其基线(噪音线)及阈值线为自动设置。当发生背景信号过高等情况而使得扩增曲线水平部分出现异常时,请手动设置基线;另外,因为不同的基因扩增出的信号大小和指数期的位置会有所不同,当阈值线位置不当而导致结果分析有误差时,请手动设置阈值线,以下为手动设置基线及阈值线的方法。

4.1 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪

基线设置:点击 Analysis settings 选择基线设置不正确的反应孔,取消“Auto Threshold”和“Auto Baseline”选项,设置“Start /End Cycle”为扩增信号出现的前一个循环点击“Analysis。”

阈值线设置:点击 Analysis settings 选择基线设置不正确的基因,取消“Auto Threshold”设置“threshold”数值点击“Analysis”

4.2 Bio-Rad CFX-96 型荧光定量 PCR 仪

基线设置:在“定量”选项卡的荧光基团选择器中选择一个荧光基团,方法是单击扩增图表下方荧光基团名称旁边的框,选择设置基线阈值以打开“基线阈值”窗口,调整每个反应孔的开始和结束基线循环,在“基线循环”窗格中,通过单击行号选择一个或多个反应孔,单击左上角可选择全部反应孔,按住 Ctrl 键可选择多个单独的反应孔,而按住 Shift 键则可选择多个连续的反应孔,为所有选定的反应孔调整基线起点循环和基线终点循环,或在电子表格底部更改开始和结束循环数,单击确定。

阈值设置:单击扩增图表中的阈值线,然后垂直移动鼠标指针即可。

4.3 罗氏 Cobas z480 型荧光定量 PCR 仪

基线设置:点击 Analysis,在 create new analysis 中选择 Abs Quant/Fit Points,在弹出框中点击√,选择 Noise Band 窗口,在 Noiseband(Auto)下拉菜单中选择 noiseband (Fluoresc)选项,单击扩增图表中的噪音线(基线),然后垂直移动鼠标指针即可。

阈值设置:在 Noise Band 窗口,选择 Analysis 窗口,单击 Threshold(Auto),然后垂直移动鼠标指针即可调整阈值线。

5. 质量控制

5.1 内标:所有反应孔内标通道均应出现 S 型曲线,且 Ct 值<25;

5.2 阴性质控品:靶基因通道无 S 型扩增曲线,或在报告界面无 Ct 值显示;或同一位点两个扩增反应 Ct 值均>25;内标通道有 S 型曲线,且 Ct 值≤25;

5.3 MTHFR677 阳性质控品 1:靶基因通道有 S 型扩增曲线,且 Ct 值<25; MTHFR677(T) Ct 值-MTHFR677(C) Ct 值≥5;

5.4 MTHFR677 阳性质控品 2:靶基因通道有 S 型扩增曲线,且 Ct 值<25; |MTHFR677(C) Ct 值-MTHFR677(T) Ct 值|<3;

5.5 MTHFR677 阳性质控品 3:靶基因通道有 S 型扩增曲线,且 Ct 值<25; MTHFR677(C) Ct 值-MTHFR677(T) Ct 值≥5;

以上条件必须要在同一次实验中全部满足,否则本次实验结果无效。

【检测结果的解释】

样本分析判读:

1. 每个样本内标通道 Ct 值≤25,且靶基因通道两个扩增反应中至少其中一个 Ct 值<25 (靶基因通道无扩增曲线,Ct 值按 30 计算),满足此条件后按下表判读:

表 5 MTHFR677(C/T)结果判读

检测名称	Ct 值	结果	判断
MTHFR677(C)	Ct=A	B-A≥5	CC 基因型
MTHFR677(T)	Ct=B	B-A<5	CT 基因型
		A-B≥5	TT 基因型

2. 若样本内标通道 Ct 值>25,则检测无效,建议重新提取样本。

3. 若样品内标通道 Ct 值≤25,且靶基因通道 3≤|B-A|<5,则检测无效,建议测序。

【检验方法的局限性】

1. 本检测结果仅供临床参考,如需确诊请结合临床症状和其他检测手段。
2. 当样本 DNA 浓度低于试剂盒的最低检测限时,可能无法准确检出。
3. 扩增产物的污染和核酸提取中标本间的交叉污染,会导致不确定结果。因此,PCR 临床实验室需要有严格的实验室分区、实验室管理和质量控制措施。
4. 不合理的样本采集、转运及处理有可能影响实验结果。
5. 请严格按照本说明书要求进行试剂操作及存储,错误的操作及试剂仓储条件的改变均可能导致结果的不准确。
6. 本试剂盒仅限于检测 MTHFR 基因 677 位点 C>T 的基因多态性,其它多态性不在本试剂盒检测范围内。

【产品性能指标】

1. 最低检测限:10ng 样本能准确检测出对应基因型。
2. 特异性:使用试剂盒检测相应阴性参考品,检测结果均为阴性。
3. 准确性:使用试剂盒检测相应阳性参考品,检测结果均为对应基因型。
4. 精密度:同一批试剂重复检测精密度参考品 10 次,检测结果均为对应基因型,且检测结果 Ct 值变异系数 CV 值≤5%。
5. 干扰物质:高浓度血红蛋白(≤200g/L)、高浓度甘油三酯(≤37mmol/L)、高浓度胆红素(≤342μmol/L)和高浓度尿酸(15ng/mL)对 PCR 结果无明显干扰。

【注意事项】

1. 本产品仅用于体外诊断。
2. 本试剂盒中的阴性质控品为纯水,阳性质控品均为核酸,均无传染性,但操作时应仍视为传染性物质进行处理。
3. 开始检测前请仔细阅读本说明书,操作人员应经过专业培训,具有合格的操作技能,并严格按照说明书要求进行操作。
4. 样本操作和处理、实验后的废弃物,如吸头、扩增产物的处理需符合相关法规要求:卫生部《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》等。
5. 使用本产品时,应遵循临床基因扩增实验室的技术规范进行操作。实验过程应分区进行(试剂准备区、样本制备区、扩增和产物分析区)各区的仪器、耗材、试剂等独立专用,不得交叉使用,各区间人员流动及空气流动应有严格要求,最大限度避免交叉污染。
6. 为了保护操作者和避免环境污染,样本处理应在生物安全柜内进行操作。
7. 实验用的消耗品(如离心管、吸头等)应保证无核酸酶及其他污染。
8. PCR 仪应定期校准及维护,以保证实验结果的可靠性。

【参考文献】

- [1] 中国心脑血管疾病报告 2015, 国家心血管病中心。
- [2] 中国高血压防治指南 2015, 中国高血压防治指南修订委员会。
- [3] Klerk, M, et al. "MTHFR 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis." Jama 288.16(2002):2023-2031.
- [4] Huh, Hee Jin, et al. "Gene-nutrition interactions in coronary artery disease: Correlation between the MTHFR C677T polymorphism and folate and homocysteine status in a Korean population." Thrombosis Research 117.5(2006):0-506.
- [5] Wu, Yi Le, et al. "Association between methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T/A1298C polymorphisms and essential hypertension: A systematic review and meta-analysis." Metabolism 63.12(2014):1503-1511.
- [6] Cranton, Elmer M., and J. P. Frackelton. "Free Oxygen Radical Pathology and EDTA Chelation Therapy: Mechanisms of Action." Journal of Advancement in Medicine 11.4(1998):277-310.
- [7] Holmes, M. V., 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 randomised trials." Lancet 378.9791(2011):584-594.
- [8] 李建平, et al. "H 型高血压诊断与治疗专家共识." 中华高血压杂志 8.2(2016):243-248.
- [9] Senemar S,Saffari B,Sharifkazemi MB,et al. 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism, homocysteine concentration and the extent of premature coronary artery disease in southern Iran[J]. EXCLI J, 2013,12:437-48.
- [10] 付龙,孙溢晗,张月兰. MTHFR 基因 C677T 多态性与 H 型高血压合并冠心病患者 HCY、冠状动脉病变的关系[J]. 中国医科大学学报,2015, 44(4):351-356.

【基本信息】

注册人/生产企业名称:北京旌准医疗科技有限公司

住 所:北京市北京经济技术开发区经海四路 156 号院 14 号楼 4 层

联系方式:

售后服务单位名称:北京旌准医疗科技有限公司

联系方式:

生产地址:北京市北京经济技术开发区经海四路 156 号院 14 号楼 4 层、11 号楼 4 层

生产许可证编号:

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准日期及修改日期】