

人 MTHFR 基因检测试剂盒(荧光 PCR 熔解曲线法)说明书

【产品名称】

通用名称：人 MTHFR 基因检测试剂盒(荧光 PCR 熔解曲线法)

【包装规格】

6 人份/盒、48 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人静脉全血样本中 MTHFR 基因 c.677 C>T 位点的基因多态性。

本试剂盒检测结果仅供临床参考，不应作为患者用药的唯一依据，临床医生应结合患者病情、疗效及其他实验室检测指标对本产品的检测结果进行综合判断。

亚甲基四氢叶酸还原酶（methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR）不仅是叶酸代谢的还原酶，同时也是甲硫氨酸代谢的关键酶之一。研究证实人 MTHFR 基因常见的 c.677 位点（C>T）突变会导致其编码的亚甲基四氢还原酶活性降低，引起叶酸代谢障碍，叶酸水平降低、同型半胱氨酸升高^[1]。叶酸水平不足会干扰孕早期胎儿的神经管闭合，导致唇、腭裂等多种出生缺陷^[2]。而高同型半胱氨酸使血管内皮损伤及功能异常，刺激血管平滑肌细胞增生，破坏机体凝血和纤溶系统，使机体处于血栓前状态^[3]。报道显示高同型半胱氨酸水平是冠心病、脑卒中

等血管性疾病的一个独立危险因素^[4-5]。

因此本试剂盒检测结果为冠状动脉粥样硬化性心脏病、高血压、心力衰竭、心绞痛、高同型半胱氨酸血症等相关心血管疾病患者提供辅助诊断。

【检验原理】

本试剂盒采用荧光 PCR 熔解曲线法，采用特异性引物扩增目的基因，再利用荧光标记探针与 PCR 产物形成的双链杂交体，根据双链杂交体的熔点不同，通过分析熔解曲线判断目的基因是否存在突变及相应的突变类型。

【主要组成成分】

试剂盒主要组分见表 1。

表 1 试剂盒主要组成成分

试剂盒组成	规格（管）		主要成分
	6 人份/盒	48 人份/盒	
PCR 混合液	105μL	840μL	脱氧核糖核苷三磷酸（dNTP）、缓冲液、引物、探针
DNA 聚合酶	3μL	24μL	DNA 聚合酶（Taq 酶）
野生型对照	25μL	25μL	MTHFR 677CC 质粒
突变型对照	25μL	25μL	MTHFR 677TT 质粒

注：不同批号组分之间不能互换。

需要但未提供的材料：

- 1) 空白对照品可采用灭菌注射用水，请用户自备。
- 2) 核酸提取或纯化试剂（型号：离心柱法 BSPC-D-M 型）【备案号：粤穗械备 20170053 号】或核酸提取或纯化试剂（型号：磁珠法 DR-4801-KZ 型）【备案号：粤潮械备 20210003】

【储存条件及有效期】

-15℃以下保存，有效期 12 个月。

避免反复冻融，冻融次数不超过 6 次。

采用冰袋加干冰包装运输，运输时间不超过 100 个小时，运输温度范围为 -75℃~0℃。开箱温度不超过 0℃。

生产日期：见标签。

有效期至：见标签。

【适用仪器】

荧光 PCR 仪：上海宏石 SLAN-96S；Roche LightCycler 480 II。

【样本要求】

本试剂盒适用于人全血（Na₂EDTA 抗凝或 K₂EDTA 抗凝）样本的检测。检测前需提取样本中人类基因组 DNA，具体方法及要求参见检验方法中样本准备。建

议全血样本采集后若未能立即提取，可于 2~8℃ 保存并在 7 天内完成提取；或于 -15℃ 以下保存，并在 6 个月内完成提取。样本冻融次数应不超过 5 次。

【检验方法】

一、样本准备 (标本制备区)

1. 使用广州凯普医药科技有限公司的核酸提取或纯化试剂（型号：离心柱法 BSPC-D-M 型）【备案号：粤穗械备 20170053 号】或潮州凯普生物化学有限公司的核酸提取或纯化试剂（型号：磁珠法 DR-4801-KZ 型）【备案号：粤潮械备 20210003】提取样本 DNA。空白对照需参与提取。

2. 取 2 μL 抽提好的 DNA 样本作为模板进行 PCR 扩增；剩余 DNA 样品存储于 -15℃ 以下备用，冻融次数不超过 5 次，保存时间不超过 6 个月。

二、扩增试剂准备 (试剂准备区)

1. 从试剂盒中取出 PCR 混合液，室温下避光解冻，上下颠倒混匀后，8000 转/分钟 10 秒。从试剂盒中取出 DNA 聚合酶，8000 转/分钟离心 10 秒。然后按照表 2 配制扩增试剂：

表 2 扩增试剂的制备

组份	PCR 混合液	DNA 聚合酶
1 人份用量	17.5 μL	0.5 μL
10 人份用量	175 μL	5 μL

2. 将配制好的扩增试剂充分混匀，8000 转/分钟离心 1 分钟，向设定的 n 个 PCR 反应管，分别加入 18μL 配制好的扩增试剂，转移到样品处理区。

三、加样 (标本制备区)

1. 在对应的PCR反应管中分别加入2μL处理好的样本DNA、野生型对照、突变型对照、空白对照，盖紧管盖，稍做离心。（反应总体积为20μL/人份）
2. 转移到检测区，放入适用的荧光 PCR 检测仪内，记录样本摆放顺序。

四、PCR 扩增与熔解曲线分析 (扩增区)

扩增与熔解曲线分析步骤程序设定见表 3，荧光信号采集通道为 FAM 通道。
上海宏石 SLAN-96S 的检测模式为标准熔解曲线，Roche LightCycler 480 II 的检测模式为 Mono Color Hydrolysis Probe/UPL Probe。

表3 扩增程序的设定

程序	循环数	温度	时间	采样模式
1	1	95℃	10 min	无
2	45	95℃	15 sec	无
		56℃	20 sec	采集荧光
		72℃	20 sec	无
3	1	95℃	1 min	无
4	1	40℃	3 min	无
Melt curve	1	40℃→80℃	Continuous	0.05℃/ sec连续采集荧光

【阳性判断值】

本试剂盒是定性检测试剂，不能用于定量检测。本说明书中各 T_m 值是在上海宏石SLAN-96S仪器上所得的常见值作为参考值，见表4。当使用Roche LightCycler 480 II时， T_m 值可能略有变动，以当次试验野生型对照和突变型对照的 T_m 值为准。

当仪器给出一个以上 T_m 值时，请参考野生型对照、突变型对照的峰型选择有效 T_m 值。当出现仪器无法自动给出 T_m 值的情况时，可通过调整基线或直接人工判读的方法获得 T_m 值。

表4 T_m 参考值

通道	检测项	T_m 参考值(℃)
FAM	MTHFR c.677 C>T	突变型对照熔解峰 T_m : 58.5±1.5 野生对照熔解峰峰 T_m : 67±1.5

【检验结果的解释】

1. 野生型对照 MTHFR c.677 C>T 检测位点的熔解峰为单峰且 T_m 值符合表 4 所示的相应 T_m 参考值范围；突变型对照 MTHFR c.677 C>T 检测位点的熔解峰为单峰且 T_m 值符合表 4 所示的相应 T_m 参考值范围。空白对照无熔解峰。

2. 当野生型对照和突变型对照的熔解峰 T_m 值符合表 4 所示的 T_m 值范围，即可对待测样本进行分析：

(1) 若样本有熔解峰，判读如下：

样本熔解峰类型	ΔT_m 类型	结果判读
左单峰	样本熔解峰—突变型对照熔解峰 ≤ 1.5	纯合突变型
	样本熔解峰—突变型对照熔解峰 > 1.5	重新检测*
右单峰	样本熔解峰—野生型对照熔解峰 ≤ 1.5	野生型
	样本熔解峰—野生型对照熔解峰 > 1.5	重新检测*
双峰	样本熔解峰—突变型对照熔解峰 ≤ 1.5 且 样本熔解峰—野生型对照熔解峰 ≤ 1.5	杂合突变型
	样本熔解峰—对应的对照熔解峰 > 1.5	重新检测*

注：“*”表示 | ΔT_m | $> 1.5^\circ\text{C}$ 时，重新对该样本 DNA 进行检测，若再次检测的 | ΔT_m | 仍大于 1.5°C ，则重新提取 DNA 进行检测。

(2) 若检测结果无熔解峰，该样本需重新检测，必要时重新提取 DNA 进行检测。

本试剂盒检测结果分析参照表 5，检测基因扩增熔解曲线结果见图 1。

表 5 结果分析

通道	检测项	突变型 熔解峰	野生型 熔解峰	结果
FAM	MTHFR c.677 C>T	+	-	纯合突变型(TT)
		-	+	野生型(CC)
		+	+	杂合突变型(CT)

注：“+”表示有熔解峰，“-”表示无熔解峰。

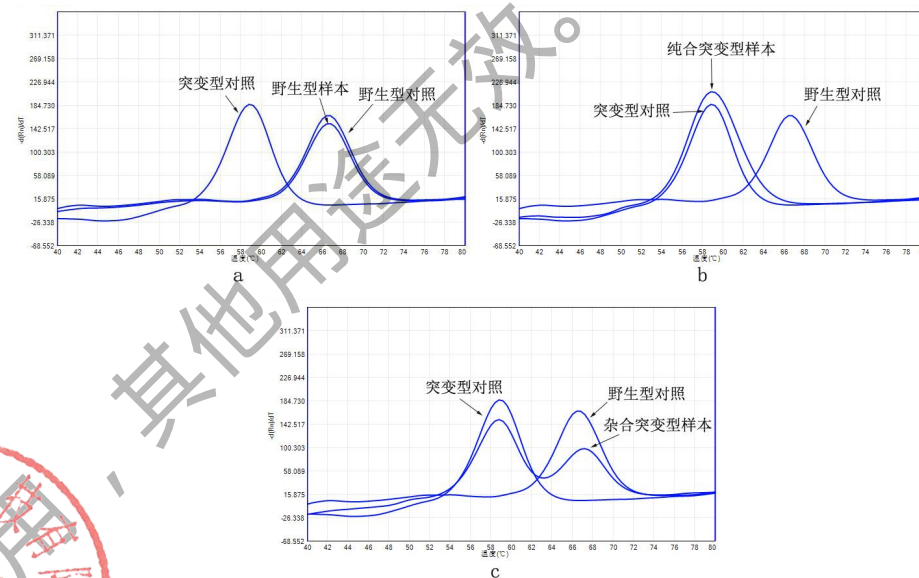


图 1 本试剂盒检测基因扩增熔解曲线结果图示

注：a、b、c 对应 MTHFR c.677 C>T 位点检测结果 (FAM 通道)

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒检测结果用于辅助指导临床治疗药物的选择，仅供临床参考不得作为临床诊治的唯一依据。
2. 本试剂盒所设计引物探针序列区域若存在其他基因变异，可能导致检测结果异常。

【产品性能指标】

1. 准确性：检测试剂盒检测范围内准确性参考品，检测结果符合相应的基因型别。
2. 特异性：检测试剂盒检测范围外的特异性参考品，检测结果为相应基因型别；检测非人类基因组的特异性参考品，检测结果为未检出相应基因型别。
检测试剂盒检测范围内的含干扰性物质的参考品，结果应符合相应的基因型别。
3. 检测限：检测检测限参考品（浓度5ng/μL），检测结果符合相应的基因型别。
4. 重复性：检测重复性参考品10次，结果一致且均为对应基因型别。
5. 干扰物验证：高血脂样本中甘油三酯含量在6.70mmol/L之内，黄疸样本中胆红素含量在450μmol/L之内及溶血样本中血红蛋白含量在109g/L之内，样本白蛋白含量在500mg/mL之内对检测结果没有干扰。外源性干扰物质阿司匹林（5mg/mL），格列齐特（5mg/mL），厄贝沙坦（5mg/mL）对样本检测结果无干扰。
6. 临床试验总结：在三家临床单位完成临床试验，与已批准上市的同类试剂相比，总一致率100.00%，杂合突变一致率100.00%，纯合突变一致率100.00%，突变一致率（阳性一致率）为100.00%，野生型一致率（阴性一致率）为100.00%。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅适用于体外诊断检测。
2. 反复冻融，如需多次使用，请在第一次融解后分装冻存。
3. 请严格按照相关主管部门颁布的基因扩增实验室管理规范执行。
4. 实验请严格分区操作，各区物品不得交叉使用，每个区使用专用的仪器和设备。PCR试剂盒不应存放于标本制备区。
5. 试剂盒内各组分在使用前要充分溶解混匀后稍做离心。
6. 加样时应使样本加入反应液中，不应有样本黏附在管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。推荐在制备反应试剂盒添加DNA模板时，使用单独、专用的移液枪和滤芯枪头。
7. 扩增完毕后取出反应管，请勿打开反应盖，并丢弃于指定的袋子中。

【参考文献】

- [1] Tokgozoglu S L , Alikasifoglu M , Unsal I , et al. Methylene tetrahydrofolate reductase genotype and the risk and extent of coronary artery disease in a population with low plasma folate [J]. Heart, 1999, 81(5):518-522.
- [2] 贺宪民, 张群, 杨琦, et al. 亚甲基四氢叶酸还原酶和甲硫氨酸合成酶还原酶基因多态性研究[J]. 中国计划生育学杂志, 2010(1):13-18.
- [3] 张燕, 谢汝萍, 陈大方, et al. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与脑出血的相关研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2003, 20(5):417-417.

[4] Cacciapuoti F. Hyper-homocysteinemia: a novel risk factor or a powerful marker for cardiovascular diseases Pathogenetic and therapeutical uncertainties [J]. Journal of Thrombosis & Thrombolysis, 2011, 32(1):82-88.

[5] Clarke R, Halsey J, Bennett D, et al. Homocysteine and vascular disease: review of published results of the homocysteine-lowering trials [J]. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2011, 34(1):83-91.

【基本信息】

注册人：广州凯普医药科技有限公司

住所：广州市黄埔区九龙镇中新知识城凤凰三横路71号2号试剂车间四楼

联系方式：020-34072008

售后服务单位名称：广州凯普医药科技有限公司

联系方式：020-34072008

生产地址：广东省广州市黄埔区九龙镇中新知识城凤凰三横路71号生产实验楼3层、6层A区、601、602，2号试剂车间1至4层，仓库1层C区、2层B区、3层B区，2号标准车间4层A区、5层A区、6层A区

生产许可证编号：粤食药监械生产许20173077号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准 20233401162

【说明书核准日期及修改日期】

说明书核准日期：2023年08月16日

说明书修改日期：2023年11月06日

