

MTHFR 和 MTRR 基因检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书
（仅供科研使用）

- 【产品名称】
MTHFR 和 MTRR 基因检测试剂盒（荧光 PCR 法）
- 【包装规格】
24 人份/盒
- 【背景介绍】

用于定性检测全血样本中 MTHFR 基因 677 位点 C>T、1298 位点 A>G 和 MTRR 基因 66 位点 A>G 的多态性。

【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 和 MTRR 基因序列，分别在 MTHFR（C677T）、MTHFR（A1298C）及 MTRR（A66G）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&MTRR PCR 反应液 P	Taq 酶、UDG 酶、dNTP、Mg ²⁺	900μL×2 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	MTHFR1298 引物探针混合液 A	引物、探针	204μL×1 管
5	MTHFR1298 引物探针混合液 C	引物、探针	204μL×1 管
6	MTRR66 引物探针混合液 A	引物、探针	204μL×1 管
7	MTRR66 引物探针混合液 G	引物、探针	204μL×1 管
8	MTHFR677 阳性质控品 1	MTHFR677 CC 型 DNA	40μL×1 管
9	MTHFR677 阳性质控品 2	MTHFR677 CT 型 DNA	40μL×1 管
10	MTHFR677 阳性质控品 3	MTHFR677 TT 型 DNA	40μL×1 管
11	MTHFR1298 阳性质控品 1	MTHFR1298 AA 型 DNA	40μL×1 管
12	MTHFR1298 阳性质控品 2	MTHFR1298 AC 型 DNA	40μL×1 管
13	MTHFR1298 阳性质控品 3	MTHFR1298 CC 型 DNA	40μL×1 管
14	MTRR66 阳性质控品 1	MTRR66 AA 型 DNA	40μL×1 管
15	MTRR66 阳性质控品 2	MTRR66 AG 型 DNA	40μL×1 管
16	MTRR66 阳性质控品 3	MTRR66 GG 型 DNA	40μL×1 管
17	MTHFR&MTRR 内标质控品	内标质粒	80μL×1 管
18	MTHFR&MTRR 阴性质控品	纯化水	800μL×1 管

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】

-20℃±5℃避光保存；效期为 12 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】

- 检测样本类型：抗凝全血标本。
- 样本采集：样本采集：抽取静脉血 2～5mL，置于 EDTA 抗凝管(紫盖)内，轻轻颠倒混匀。
- 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。
- 运输：密封冷冻运输，避免解冻和漏液。

【检验方法】

- 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，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：N1=待检样本数(n)+MTHFR677 阳性质控品数(3)+MTHFR&MTRR 阴性质控品数(1)+1；N2=待检样本数(n)+MTHFR1298 阳性质控品数(3)+MTHFR&MTRR 阴性质控品数(1)+1；N3=待检样本数(n)+MTRR66 阳性质控品数(3)+MTHFR&MTRR 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×N1	MTHFR&MTRR PCR 反应液 P 12.5×N1
B	MTHFR677 引物探针混合液 T 8.5×N1	MTHFR&MTRR PCR 反应液 P 12.5×N1
C	MTHFR1298 引物探针混合液 A 8.5×N2	MTHFR&MTRR PCR 反应液 P 12.5×N2
D	MTHFR1298 引物探针混合液 C 8.5×N2	MTHFR&MTRR PCR 反应液 P 12.5×N2
E	MTRR66 引物探针混合液 A 8.5×N3	MTHFR&MTRR PCR 反应液 P 12.5×N3
F	MTRR66 引物探针混合液 G 8.5×N3	MTHFR&MTRR PCR 反应液 P 12.5×N3

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
MTHFR1298(A)	①	②	③	④	⑤	⑥	STD4	STD5	STD6	NTC
MTHFR1298(C)	①	②	③	④	⑤	⑥	STD4	STD5	STD6	NTC
MTRR66(A)	①	②	③	④	⑤	⑥	STD7	STD8	STD9	NTC
MTRR66(G)	①	②	③	④	⑤	⑥	STD7	STD8	STD9	NTC

注：①-⑥代表样本；STD1-9 分别代表 MTHFR677 阳性质控品 1-3，MTHFR1298

阳性质控品 1-3，MTRR66 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 3)，并在“Reaction Volume Per Well”内输入“25”；点击“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；点击“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，点击“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。设置结束后点击“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 3），在图形或文本模式下可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。点击“GOTO”步骤的重复次数，改变程序中的循环次数，点击“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，点击“New Experiment”进入程序设定界面。点击“Experiment”，在“Detection Format”下拉菜单选择“Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe”。点击“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：点击“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 3）：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	1

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；
 - 5.6 MTHFR1298 阳性质控品 1：靶基因通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值<25；MTHFR1298(C) Ct 值-MTHFR1298(A) Ct 值≥5；
 - 5.7 MTHFR1298 阳性质控品 2：靶基因通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值<25；|MTHFR1298(A) Ct 值-MTHFR1298(C) Ct 值|<3；
 - 5.8 MTHFR1298 阳性质控品 3：靶基因通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值<25；MTHFR1298(A) Ct 值-MTHFR1298(C) Ct 值≥5；
 - 5.9 MTRR66 阳性质控品 1：靶基因通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值<25；MTRR66(G) Ct 值-MTRR66(A) Ct 值≥5；
 - 5.10 MTRR66 阳性质控品 2：靶基因通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值<25；MTRR66(A) Ct 值-MTRR66(G) Ct 值|<3；
 - 5.11 MTRR66 阳性质控品 3：靶基因通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值<25；MTRR66(A) Ct 值-MTRR66(G) Ct 值≥5；
- 以上条件必须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 <3	CT 基因型
		A-B≥5	TT 基因型

表 6 MTHFR1298(A/C)结果判读			
检测名称	Ct 值	结果	判断
MTHFR1298(A)	Ct=A	B-A≥5	AA 基因型
MTHFR1298(C)	Ct=B	B-A <3	AC 基因型
		A-B≥5	CC 基因型

表 7 MTRR66(A/G)结果判读			
检测名称	Ct 值	结果	判断
MTRR66(A)	Ct=A	B-A≥5	AA 基因型
MTRR66(G)	Ct=B	B-A <3	AG 基因型
		A-B≥5	GG 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. 测定结果仅供科学研究，不得用于临床患者的诊断判定。
- 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，错误的操作及试剂盒储存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、1298 位点 A>C 和 MTRR 基因 66 位点 A>G 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）和高浓度叶酸（15ng/mL）对 PCR 结果无明显干扰。

【注意事项】

- 1. 测定结果仅供科学研究，不得用于临床患者的诊断判定。
- 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、实验后的废弃物品，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] Hu J, Zhou G W, Wang N, et al. MTRR A66G polymorphism and breast cancer risk: a meta-an [J]. Breast cancer research and treatment, 2010, 124(3): 779-784.
- [2] Castro R, Rivera I, Ravasco P, et al. 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C→T and 1298A→C mutations are associated with DNA hypomethylation[J].Journal of medical genetics, 2004, 41(6): 454-458.

【基本信息】

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：

电话号码：010-56380026

传真号码：010-56380029

售后服务单位名称：北京旌准医疗科技有限公司

联系方式：

电话号码：010-56380026

传真号码：010-56380029

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

【说明书核准日期及修改日期】

V01A

MTHFR 和 MTRR 基因检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

（仅供科研使用）

起草人	研发审核	转化审核	生产审核	批准人	版本号
					V01A 版
年 月 日	年 月 日	年 月 日	年 月 日	年 月 日	

版本	执行日期	更改项目
V01	2019. 04. 04	新建
V01A	2022. 01. 25	1. 将预期用途改为背景介绍； 2. 将背景介绍的与诊断疾病相关的描述去掉； 3. 注意事项添加“测定结果仅供科学研究，不得用于临床患者的诊断判定”； 4. 联系电话变更为 010-56380026。