

人 MTHFR 基因多态性检测试剂盒 (PCR-荧光探针法)

说明书

【产品名称】

通用名称：人 MTHFR 基因多态性检测试剂盒 (PCR-荧光探针法)

【包装规格】

24 人份/盒、48 人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人全血样本中亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR) 基因 677 位点 (C>T) 基因多态性，共包含 577 C/C、677 C/T 和 677 T/T 三种基因型。

临床适应症背景：

叶酸属 B 族维生素，是合成核酸所必需的元素，是细胞生长和组织修复所必需的物质，更是胚胎发育过程中不可缺少的营养素，叶酸缺乏是导致出生缺陷的主要原因之一，叶酸缺乏多由遗传缺陷导致的机体对叶酸代谢障碍^[1]。

研究证实^[2]，MTHFR 是同型半胱氨酸 (Hcy) 代谢途径中的关键酶。MTHFR 基因变异引起相应的酶活性降低可抑制同型半胱氨酸转化为甲硫氨酸，导致低叶酸血症和高同型半胱氨酸血症，从而增加新生儿出生缺陷风险或心脑血管疾病等风险^[3-12]。

在中国人群中常见的突变位点是 MTHFR C677T^[14]，对 MTHFR 基因进行检测^[3]，确定突变基因型，能够为临床诊断提供更有力的科学证据^[15]。

相关的临床或实验室诊断方法：

传统的叶酸代谢基因突变诊断方法有 PCR-基因芯片杂交法、Sanger 测序法和 qPCR 法等^[16]。

【检验原理】

本试剂盒产品采用多重 PCR 结合多色 Taqman 荧光探针技术。

多重 PCR：根据 NCBI 上公布的 MTHFR 基因信息，参考国内主要叶酸代谢基因分型研究论文，选择国内人群中常见的基因位点 MTHFR C677T，根据各位点所在区域的基因序列特点，设计高度特异的引物和多色荧光探针，1 管进行多重荧光 PCR 检测。

内控设置：产品以人类基因组 DNA 上的 β -actin 基因作为内控 (Internal Control, IC) 监测实验的有效性。根据其基因序列特异性设计 1 对引物与 1 条探针，内控检测探针采用 CY5 和 BHQ3 进行标记。

产品检测的突变位点、内控及其对应探针的荧光标记基团如下表：

种类	报告基团	淬灭基团
677-C	FAM	NFQ-MGB
677-T	VIC	NFQ-MGB
IC	CY5	BHQ3

多色荧光探针：针对每个突变位点的扩增子设计特异的荧光探针。探针 5' 端标记报告荧光基团 (R)，3' 端标记淬灭荧光基团 (Q)；当两种荧光基团同时标记在探针上时，报告基团发出的荧光被淬灭基团淬灭。当反应体系中有与探针碱基

序列互补配对的模板出现时，探针与模板特异杂交，在每个 PCR 循环的延伸阶段，Taq DNA 聚合酶利用其 5' -3' 外切酶活性切断探针，报告基团与淬灭基团分开后发出特征性荧光信号。通过收集和分析特定的荧光信号，判断反应体系中是否存在特定的扩增靶标，从而判断特定的位点是否存在突变。

【主要组成成分】

组成	24 人份/盒		48 人份/盒		主要成分
	规格	数量	规格	数量	
反应液	598 μ L	1 管	1196 μ L	1 管	引物、探针、脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP)、缓冲液 (10 $\times$ HA Buffer, 5 $\times$ Probe qPCR Buffer)、High Affinity HotStart Taq 酶
B 质控品	20 μ L	1 管	20 μ L	1 管	MTHFR C677T 突变人基因组 DNA
空白对照	300 μ L	1 管	300 μ L	1 管	纯化水

说明：不同批号试剂盒中反应液组分不可以互换使用，其它组分可以互换使用。

自备试剂 (本试剂盒不包括，但在实验中必须使用的试剂)

全血基因组 DNA 提取试剂：推荐使用深圳会众生物技术有限公司的“核酸提取试剂 (备案号：粤深械备 20180290)”。

【储存条件及有效期】

试剂盒置于 -30 $^{\circ}$ C~-15 $^{\circ}$ C 避光保存，有效期为 14 个月。

试剂盒开瓶后 -30 $^{\circ}$ C~-15 $^{\circ}$ C 避光保存，效期内性能稳定。

试剂盒在 37 $^{\circ}$ C 可避光保存 5 天。

试剂盒可反复冻融 6 次。

生产批号、生产日期、使用期限见标签。

【适用仪器】

基因扩增仪：Real-Time PCR System 7500, Life Technologies Holdings Pte Ltd.

【样本要求】

1. 适用样本

本试剂盒样本来源为人外周抗凝全血样本的核酸检测，所用抗凝剂为枸橼酸钠或乙二胺四乙酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)，不能使用肝素 (20 IU/mL) 抗凝。

2. 采样方法

抽取静脉血不少于 0.4mL，放入含有抗凝剂的管中，标记好样本的姓名和编号等样本信息。

3. 样本保存

抗凝全血在室温放置可保存 24 小时，2~8 $^{\circ}$ C 可保存一个月，-18 $^{\circ}$ C 以下可保存两年，冷冻保存时应避免反复冻融。提取的 DNA 样本 -18 $^{\circ}$ C 以下可保存 5 年。

4. 样本运输

抗凝全血运输时需用泡沫箱加冰袋密封，且在途时限不宜超过 72 小时。

【检验方法】

1. DNA 获取

推荐使用深圳会众生物技术有限公司的“核酸提取试剂”提取人基因组 DNA。

PCR 扩增前，可采用核酸定量仪或紫外分光光度计对模板 DNA 浓度和纯度进行测定。本试剂盒要求待检基因组 DNA 的浓度为 0.2~100ng/ μ L，纯度 (A260/A280) 为 1.7~2.0。

2. 反应液准备

从试剂盒中取出所有组分置于室温融化并振荡混匀，2000rpm 离心 20sec。PCR 反应体系人数为 N，N=待检样本数+1 管 B 质控品 +1 管空白对照反应液以 23 μ L/管分装至荧光 PCR 八联管内使用。

3. 加样 (注意避免交叉污染)

按空白对照、待检样本及 B 质控品的加样顺序，取样本 DNA 2.0 μ L 加入到分装反应液的 PCR 八联管内，反应体系总体积 25 μ L，盖紧管盖，2000rpm 离心 20sec 后置于基因扩增仪 (荧光 PCR 仪) 中并记录样本放置顺序。

4. PCR 扩增

按下表设置 PCR 扩增参数。

步骤		温度	时间	循环数
1	预变性	95℃	5min	1
2	变性	95℃	15sec	40
3	退火、延伸及荧光检测	65℃	32sec	
报告基团: FAM, VIC, CY5; 淬灭基团: NFQ-MGB; BHQ3; 参比荧光: NONE				

5. 结果分析条件设定

根据分析后图像调节基线 (Baseline)：start=3, end=18~24；

调节阈值 (Threshold)：分别手动设置各反应液各通道的阈值，设置范围为 (1.0e+004~1.0e+005)，可根据每个待检样本的实际扩增情况进行调整。

6. 质控标准

序号	质控品	质控标准
1	空白对照	IC 与位点通道均为阴性
2	B 质控品	(1) IC 通道：阳性；(2) 位点通道：阳性。
说明：以上要求须在同一次实验中同时满足，否则，本次实验视为无效。		

7. 结果判断

本试剂盒检测 MTHFR C677T 位点。

根据设置的基线和阈值线，仪器会自动显示检测 Ct 值，根据 Ct 值即可对结果进行判读 (检测样本结果按下表分别进行判断)。

序号	样本检测结果		报告结果
1	IC 通道 Ct<36		提示样本 DNA 可用
	IC 通道 Ct> 36		提示 DNA 质量较差，建议重提 DNA 再复检
2	位点通道 Ct<36		结果有效，根据起跳信号进行分型
3	位点通道 Ct≥40		结果无效
4	36≤Ct < 40，建议重提 DNA 后复检	重检 Ct<36	结果有效，根据起跳信号进行分型
		重检 Ct≥40	结果无效
		重检 36≤Ct < 40	建议进行核酸序列测定进一步验证

不同基因型对应的各荧光通道检测结果见下表：

基因型	FAM 通道	VIC 通道	CY5 通道
-----	--------	--------	--------

677 C/C (正常)	阳性	阴性	阳性
677 C/T (杂合)	阳性	阳性	阳性
677 T/T (纯合)	阴性	阳性	阳性

【阳性判断值】

本试剂盒对检测对象进行定性分析,以检测位点 Ct 值进行结果判断。阳性判断值即为能够获得理想的临床灵敏度和临床特异性的临界值 (Cutoff),对于本产品即为 Ct 值的研究确定值。本研究经过对 192 例突变样本 (包含 127 例 677 C/T 杂合突变与 65 例 677 T/T 纯合突变) 及 200 例 677 C/C 正常样本的检测,采用受试者工作特征(ROC)曲线的方式进行相关评价,根据 ROC 曲线面积(AUC)与 Youden 指数最大的切点分析得出各通道的阳性判断值均为 Ct<36。

【检验结果的解释】

- 1.反应液扩增β-actin 基因为内控 (IC),只有当内控扩增曲线满足 Ct<36,才能根据位点的 Ct 值进行结果判断。
- 2.反应液可对位点进行基因型。
- 3.各通道的阈值线设置可根据每例样本的实际扩增信号单独调整,在满足内控扩增正常的条件下,位点通道如有弱于同管内控的扩增曲线 (位点通道△Rn 值<IC 通道△Rn 值)且有明显拐点,可参考下述条件分析结果:
 - (1) 若△Rn 低于阈值线参考范围最大值 (1.0e+005),同时位点扩增曲线的 Ct 值与内控扩增曲线的 Ct 值接近时 (Ct 差值<5),则可适当降低该样本的位点通道阈值线进行结果判断。
 - (2) 若△Rn 低于阈值线参考范围最大值 (1.0e+005),同时位点扩增曲线的 Ct 值与内控扩增曲线的 Ct 值差值较远 (Ct 差值>5),提示可能样本质量有较大问题,需重新提取样本进行检测。

【检验方法的局限性】

- 1.本试剂盒为定性产品,不对叶酸代谢基因进行定量测定。
- 2.本试剂盒检测中国人常见的 1 种基因位点 MTHFR C677T,其他位点类型在本试剂盒检测范围之外无法检出,这类样本可用核酸序列测定进一步验证。
- 3.本试剂盒内的引物和探针所覆盖区域可能存在其他未知单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP),从而影响引物和探针的结合效率导致无法检出。
- 4.本试剂盒无法检测 DNA 浓度在 0.2ng/μL 以下的样本。
- 5.使用肝素抗凝剂的全血样本需排除。
- 6.以下样本需剔除:
 - (1) 与试剂盒说明书中的采样方法、样本保存、样本运输要求不符的样本;
 - (2) 凡不符合入选标准或者符合排除标准而被误入选的样本;
 - (3) 操作者的误操作导致结果无法使用或没有检测结果的样本;
 - (4) 任何因素造成的样本污染。
- 7.本试剂盒的检测结果仅供临床参考,不能单独作为确诊或排除病例的依据,为达到诊断目的,此检测结果要与临床检查、病史和其他的检查结果综合使用。

【产品性能指标】

1. 测定准确性

对测定准确性进行研究,选用 30 例包含该位点共 3 种基因型的临床样本,每例样本均包含高、中、低 3 个浓度,每个浓度重复检测 3 次,均用 3 批产品进行检测,

分别计算该基因位点基因型的符合率。结果显示相应的位点基因型,研究结果与对比试剂检测结果完全符合,产品符合率为 90/90。

2. 最低检测限

对最低检测限进行研究,选用 3 例包含该位点共 3 种基因型的临床样本,每种样本包含 7 个浓度梯度,每个浓度重复检测 12 次,均采用 3 批产品检测进行检测。确定本试剂盒能稳定检出基因组 DNA 的最低浓度为 0.2ng/μL。

3. 分析特异性

对特异性进行研究,均采用 3 批产品进行检测,结果如下:

通过干扰筛查试验,当全血样本中甘油三酯≤13.5mmol/L 或总胆红素≤358.24μmol/L 时,不是本试剂盒的干扰物质,溶血样本不影响本试剂盒检测结果。

通过干扰评价试验,20IU/mL 肝素抗凝剂是本品的的外源性干扰物质,2mg/mL 枸橼酸钠或 5mg/mL EDTA 作抗凝剂不是本品的干扰物质。当全血样本中依那普利叶酸≤40 mg/mL 或维生素 B6≤1000 mg/mL 时,不影响本试剂盒的检测。

用本试剂盒检测临床样本:包括 G6PD 缺乏症样本、缺失型α-地贫样本 (α⁻³⁷/αα)、非缺失型α-地贫样本 (α^{CS}α/αα),弓形虫感染 DNA 样本、巨细胞病毒感染全血样本、大肠杆菌 DNA 样本,检测结果与核酸序列测定结果比较分析均无交叉反应。

4. 精密度

对精密度进行研究,选择包含该位点基因型的临床样本,每种样本选择高、中 2 个浓度,均采用 3 批产品进行检测,一天做 2 次,每次试验每例样本重复检测 2 次,连续检测 20 天。结果显示特异突变位点及 IC 均能稳定检出,批内不精密度和批间不精密度变异系数 (CV 值)均小于 5.0%。

5. 对比试验

该产品临床试验研究选择三家临床单位共检测 1040 例临床样本,结果 MTHFR C677T 突变基因型总体统计总阳性符合率为 100%,总阴性符合率为 100%,总符合率为 100%。

【注意事项】

1. 试剂盒必须严格按照所要求的保存条件保存,各组分使用前请充分融化、混匀并稍事离心后再开盖使用,以保证反应体系体积完整及防止潜在的污染。
2. 请严格分区操作实验,各区物品均为专用,实验室环境污染、试剂污染、样本交叉污染可能导致假阳性结果;试剂运输、保存不当或试剂配置不准确可能会引起试剂检测效能下降,出现假阴性或检测不准确的结果。
3. 为保证实验结果准确性,请务必在扩增前测定 DNA 浓度和纯度,确保样本符合本试剂盒的检测要求后再进行后续实验。
4. 本试剂盒适用样本为外周枸橼酸钠或 EDTA 抗凝全血,若使用其他类型的样本,出现检测结果差异与本试剂盒质量无关。
5. 反应液配置、分装及加样的操作过程中应尽量避免,加样后尽快盖紧管盖并稍事离心。
6. 每次实验应进行质量控制。
7. 检测样本应视为具有传染性物质,操作和处理均需符合相关法规要求。
8. 实验中使用的吸头请直接打入盛有消毒剂的废液缸内,并与其他废弃物一同灭菌后方可丢弃。
9. 本试剂盒仅用于体外诊断。

【参考文献】

- [1] 张淑敏. 叶酸与妊娠[J]. 继续医学教育, 2006, 20(34):62-65.
- [2] Malinow M R, Bostom A G, Krauss R M. Homocyst(e)ine, Diet, and Cardiovascular Diseases: A Statement for Healthcare Professionals From the Nutrition Committee, American Heart Association[J]. Circulation, 1999, 99(1):178-182.
- [3] Xu X, Li J, Sheng W, et al. Meta-Analysis of Genetic Studies from Journals Published in China of Ischemic Stroke in the Han Chinese Population[J]. Cerebrovascular Diseases, 2008, 26(1):48-62.
- [4] Holmes M V, Newcombe P, Hubacek J A, 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[J]. Lancet, 2011, 378(9791):584-594.
- [5] Huo Y, Li J, Qin X, et al. Efficacy of Folic Acid Therapy in Primary Prevention of Stroke Among Adults With Hypertension in China The CSPPT Randomized Clinical Trial[J]. JAMA The Journal of the American Medical Association, 2015, 313(13).
- [6] Boyi Y, Shujun F, Xueyuan Z, et al. Associations of MTHFR Gene Polymorphisms with Hypertension and Hypertension in Pregnancy: A Meta-Analysis from 114 Studies with 15411 Cases and 21970 Controls[J]. PLoS ONE, 2014, 9(2):e87497-.
- [7] 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(01):15-20.
- [8] 张春玲, 叶廷, 惠汝太. MTHFR 基因多态性及血浆同型半胱氨酸水平与老年人卒中发病的关系[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2004, 4(1):3-7.
- [9] 潘锐, 沈晓娟, 林立芳, et al. MTHFR 基因多态性及血浆同型半胱氨酸水平与冠心病的关系[J]. 心脏杂志, 2006, 18(5):542-543.
- [10] 叶辉, 邵晓梅, 蒋健刚, et al. 同型半胱氨酸与心脑血管疾病关系随访研究[J]. 心脏杂志, 2006, 18(1):60-61, 64.
- [11] Dodds L, Fell D B, Dooley K C, et al. Effect of Homocysteine Concentration in Early Pregnancy on Gestational Hypertensive Disorders and Other Pregnancy Outcomes[J]. Clinical Chemistry, 2008, 54(2):326-334.
- [12] Zhang W, Sun K, Chen J, et al. High plasma homocysteine levels contribute to the risk of stroke recurrence and all-cause mortality in a large prospective stroke population[J]. CLINICAL SCIENCE, 2009, 118(3):187.
- [13] 刘念, 阎炯, 杨林, et al. 叶酸代谢相关酶基因多态性与不良孕产关系的研究[J]. 中国计划生育学杂志, 2015, 23(5):318.
- [14] Qin X, Li J, Cui Y, et al. MTHFR C677T and MTR A2756G polymorphisms and the homocysteine lowering efficacy of different doses of folic acid in hypertensive Chinese adults[J]. NUTRITION JOURNAL, 2012, 11(1):2.
- [15] 围受孕期增补叶酸预防神经管缺陷指南工作组, 任爱国, 张雪娟, et al. 围受孕期增补叶酸预防神经管缺陷指南(2017)[J]. 中国生育健康杂志, 2017, v.28(05):5-14.
- [16] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 人民卫生出版社, 2015.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 深圳会众生物技术有限公司

住所: 深圳市宝安区新安街道兴东社区丰业源工业厂区厂房 B1 夏谷 101

联系方式: 400-8616-360

售后服务单位名称: 深圳会众生物技术有限公司

联系方式: 400-8616-360

生产地址: 深圳市宝安区新安街道兴东社区丰业源工业厂区厂房 B1 夏谷 101、西乡街道宝安大道洪盛工业园三号楼 301

生产许可证编号: 粤食药监械生产许 20203605 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20203400323

【说明书核准及修改日期】

核准日期: 2020 年 3 月 30 日

修改日期: 2021 年 08 月 18 日