

人类 MTHFR(C677T)基因多态性检测试剂盒（PCR-熔解曲线法）说明书

【产品名称】

通用名：人类 MTHFR(C677T)基因多态性检测试剂盒（PCR-熔解曲线法）

【包装规格】

24 人份/盒、48 人份/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测从人外周血提取的 DNA 中亚甲基四氢叶酸还原酶（MTHFR）基因 677 位基因型。

MTHFR 基因编码亚甲基四氢叶酸脱氢酶，该酶是调节叶酸和甲硫氨酸代谢的限速酶，它在叶酸代谢、DNA 甲基化和 DNA 合成等方面起重要作用。MTHFR 基因最常见的多态性为 C677T，该位点位于 MTHFR 的催化区域，其多态性碱基变化导致酶活性和酶的耐热性下降，当该位点由野生纯合型（CC）转变为杂合型（CT）时，酶活仅剩 65%，转变为突变纯合型（TT）时，酶活仅剩 30%。研究表明，MTHFR 酶活性的降低，一方面可引起叶酸代谢障碍，导致 5-甲基四氢叶酸水平降低，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；另一方面可导致同型半胱氨酸水平升高，引起细胞毒性、血管内皮细胞损伤、刺激血管平滑肌细胞增生、破坏机体凝血和纤溶系统，促进血栓形成，增加高同型半胱氨酸血症引起的脑卒中的发生风险，因此本试剂盒检测结果为具有低活性亚甲基四氢叶酸还原酶的高危人群提供辅助诊断。

【检验原理】

本试剂盒基于实时 PCR 平台结合了特异引物、荧光探针和熔解曲线技术，检测 DNA 样品中 MTHFR 基因 C677T 位点多态性（SNP）。本试剂盒结合特别的 PCR 反应程序和特殊 Taq 酶的使用，利用特异引物对靶序列进行高精度 PCR 扩增，通过分析比较特异的荧光探针与靶序列结合所产生的熔解曲线 T_m 值的变化，进行 SNP 分型。只出现 1 个熔解峰时为纯合型（包括野生纯合、突变纯合），同时出现 2 个峰时为杂合型（图 1）。

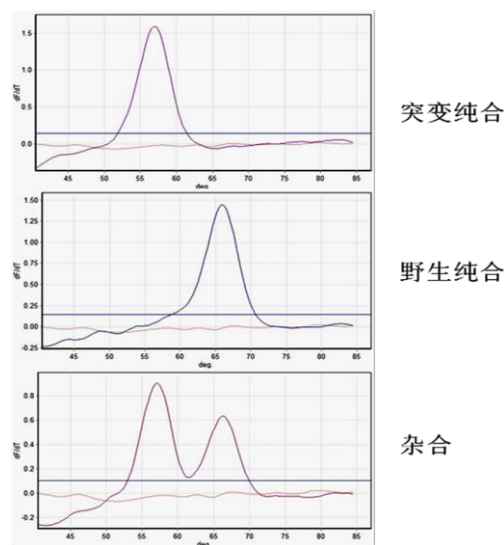


图 1 基因分型检测结果示意

【主要组成成分】

表 1 试剂盒组成

名称	组分	24 人份	48 人份
PCR 反应液 I	20-100pM 的 MTHFR 基因和内控基因特异性引物和探针	220 μ l $\times$ 1 管	220 μ l $\times$ 2 管
PCR 反应液 II	0.1U/ μ l Taq 酶、0.8mM dNTP、8mM MgCl ₂ 等	140 μ l $\times$ 1 管	140 μ l $\times$ 2 管
溶液 A	PCR 增效剂	140 μ l $\times$ 1 管	140 μ l $\times$ 2 管
阳性对照品	包含 MTHFR 基因 677T 基因型的质粒和 677C 基因型的基因组 DNA	20 μ l $\times$ 1 管	
空白对照品	纯化水	50 μ l $\times$ 1 管	

检测必须但试剂盒中不包含的组分：

1.5ml 离心管（用于配制 PCR 反应液和 DNA 提取）；

0.2ml PCR 管或 8 联 PCR 管或 96 孔 PCR 板；

带滤塞的吸头（1ml、200 μ l 和 10 μ l）；

DNA 提取试剂盒 QIAamp DNA Blood Mini Kit（货号 51104 或 51106）。

【储存条件及有效期】

置于-20℃条件下储存，有效期 6 个月。

4~10℃避光条件下储存或运输不得超过 7 天。 -20℃储存时，冻融次数不超过 5 次。

“生产日期”和“有效期至”见试剂盒标签。

【适用仪器】

适用于 ABI7500、SLAN-96P 型号的 Real-time PCR 扩增仪。

【样本要求】

1. 适用样本为 EDTA 抗凝的全血；样本在 4-10℃保存不超过 7 天，-20℃保存不超过 1 个月，避免反复冻融。
2. 使用商业化的试剂盒来提取人类基因组 DNA，推荐使用 Qiagen 公司的 QIAamp DNA Blood Mini Kit（货号 51104 或 51106）提取全血样品，所提 DNA 需用紫外分光光度计测定浓度和纯度，其 DNA OD260/OD280 的值应在 1.8~2.0，浓度应在 10~100ng/ μ l 之间，样本 DNA 质量不合格者不得用于检测，建议低于 10ng/ μ l 者重新取样进行核酸提取，高于 100ng/ μ l 者予以适当稀释至规定的浓度范围，提取完的 DNA 建议立即进行检测，否则请于-20℃以下保存，保存时间不要超过 6 个月。

【检验方法】**一、核酸提取（样本处理室）**

严格按照血液 DNA 提取试剂盒说明书提取核酸。提取过程中应采取必要的标记方法，避免试剂漏加及样

本混淆。

二、试剂准备（试剂准备室）

将试剂从冰箱取出，室温融化，混匀，1000rpm 快速离心 20 秒，备用。

三、反应体系配制（试剂准备室）

1. 根据检测样本数计算所需反应数，如样本数为 n ，则需做 $n+2$ 个反应（包含一个阳性对照反应和一个无模板对照反应）。
2. 根据表 2 计算所需各反应液的体积，并配制反应体系，反应体系混匀后 3000rpm 快速离心 30 秒，分装至 PCR 管中，每管 18 μ l。

表 2 加样表

组分	1 个反应
PCR 反应液 I	8 μ l
PCR 反应液 II	5 μ l
溶液 A	5 μ l
总体积	18 μ l

四、加样（样本处理室）

取 2 μ l 提取的样品 DNA 加入 PCR 反应管，盖上管盖，1000rpm 离心或轻甩，排除管底气泡；阳性对照反应所用模板为试剂盒中阳性对照品，空白对照反应所用模板为试剂盒中所带空白对照品。

五、上机检测（扩增室）

1. 将 PCR 管按顺序放入 PCR 仪，设置反应程序

（1）SLAN-96P 荧光定量 PCR 仪程序设置

表 3 PCR 反应参数

阶段	温度	时间	检测荧光	循环数
预变性	95℃	2min		1
循环段	94℃	15sec		50
	56℃	30sec	√	
	72℃	10sec		
	95℃	30sec		1
	45℃	20sec		
熔解段	45→75℃		√	1

注：a. 该软件熔解曲线设置时只需设置熔解的起始温度和结束温度。

b. 荧光检测通道选择 FAM 和 ROX 检测通道。

（2）ABI7500 荧光定量 PCR 仪

表 4 PCR 反应参数

阶段	温度	时间	检测荧光	循环数
----	----	----	------	-----

预变性	95℃	2min		1
循环段	94℃	15sec		50
	56℃	32sec	√	
	72℃	10sec		
熔解段	95℃	30sec		1
	45℃	60sec		
	45→75℃		√	

- 设置程序时，应取消参比荧光，具体步骤为“Setup”→“Plate Setup”→“Assign Targets and Samples”→“Select the dye to use as the passive reference”设置为“None”。
- Melt 分析时，设置温度 45~75℃；选择 Continuous 模式时，每步设置 1%，检测荧光；选择 StepAndHold 模式时，每个步骤升高 0.3℃，在每个温度都收集荧光。荧光检测通道选择 FAM 和 ROX 检测通道。

2. 运行 PCR 反应程序，保存文件。

六、结果获取

1. SLAN 荧光定量 PCR 仪运行结束后，使用配套软件对本次试验的结果进行熔解曲线导数图（-dF/dT）分析。
2. ABI7500 Software v2.0 以上版本软件不支持同时查看多个荧光通道的熔解曲线，实验结束后，按如下步骤查看结果：软件界面中点击“Setup”→“Plate Setup”→“Assign Targets and Samples”选中需要查看的反应孔→“Assign target(s) to the selected wells”中只勾选需要查看的一个荧光通道→“Analysis”→“Reanalyse”→“Melt Curve”中查看熔解曲线结果；查看另外一个荧光通道结果时，重复此过程。
3. 杂合基因型样本检测结果为双峰，ABI7500 软件只能识别峰高较高的 T_m 值，需手动读取峰高较低的 T_m 值，具体步骤为：在“Melt Curve”界面，点击所要查看的反应孔（只能选择一个孔位），拉动“竖直虚线”至不能识别峰的最高点，即可得到该峰 T_m 值；若该峰顶部为一段水平线段，则拉至该线段中间，读取 T_m 值。

【阳性判断值】

T_m 值符合下表要求且峰高大于阳性对照品峰高的 1/5，为阳性结果。

表 5 阳性 T_m 值范围

熔解峰	T _m 值（℃）
677T	55.12±1.5
677C	64.97±1.5

【检验结果的解释】

1. 空白对照应无明显熔解峰，若分析后出现明显熔解峰，可能为试剂受到污染或操作过程中的污染，请

排除污染源后重新检测。

2. 阳性对照管在熔解曲线分析后应有 2 个熔解峰，且 T_m 值应符合表 5 所示 T_m 值范围；若阳性对照管无熔解峰，或只出现 1 个熔解峰，该批次样本需重新检测。请确认所使用的试剂是否仍在有效期内，确定操作是否严格按照说明书进行。

3. 反应的内参通道 (ROX) 在熔解曲线分析后应有 1 个熔解峰，若无熔解峰，可能为样本 DNA 存在 PCR 抑制剂，应重新取样提取基因组 DNA。

4. 若满足以上要求，表明此次实验成功，对样品管进行分析：

(1) 反应管 FAM 通道为 MTHFR (677C>T) 检测通道，同时出现两个峰且 T_m 值分别符合 $55.12 \pm 1.5^\circ\text{C}$ 和 $64.97 \pm 1.5^\circ\text{C}$ 的样本为 C/T 杂合型，只出现一个熔解峰且 T_m 值符合 $55.12 \pm 1.5^\circ\text{C}$ 的样本为 T/T 纯合型，只出现一个熔解峰 T_m 值符合 $64.97 \pm 1.5^\circ\text{C}$ 的样本为 C/C 纯合型；

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

【检验方法的局限性】

本试剂盒仅适用于规定的仪器和检测系统，检测结果仅供临床参考，不得作为临床诊治的唯一依据。若本试剂盒所设计引物探针序列区存在其它基因变异，可能导致检测结果异常。

【产品性能指标】

1. 经 1050 例孕妇和腺癌患者的全血样本临床试验，本品与测序法作对照，各 SNP 位点亚型符合率均在 98% 以上。
2. 试剂盒应外观清洁、无泄漏、无破损，标志、标签字迹清楚；各组分融化后应澄清透明，无沉淀。
3. 检测 10 份基因型参考品，结果均符合相应基因型别。
4. 将 3 份最低检出量参考品分别做 10 次平行检测，可稳定检出且结果均符合相应基因型别。
5. 用 2 份企业内部精密性参考品分别作 10 次平行检测，结果均为符合相应基因型别且 T_m 值极差 $\leq 1.5^\circ\text{C}$ 。
6. 2g/L 血红蛋白、342 μM 胆红素和 37mM 脂类（甘油三酯）等干扰物质，对检测结果未见有干扰。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外研究。实验前请仔细阅读说明书。
2. PCR 检测应在有资质的临床 PCR 实验室进行，实验室应严格按照卫生部《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》卫办医政发〔2010〕194 号文件规定进行资质认定和管理。
3. 实验过程中必须使用专用的移液枪和一次性带滤塞的加样吸头。
4. PCR 操作各阶段应在不同的分区进行，分别为试剂准备室、样本处理室和 PCR 扩增室。人、物单向流动。PCR 试剂盒不应存放在样本处理区。
5. 加样时应使样品完全落入反应液中，不应有样品粘附于管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。
6. PCR 操作各阶段使用专用的仪器和设备。
7. 扩增完毕立即取出反应管，密封在专用塑料袋内，丢弃于指定地点。

8. 实验前及实验完毕后应该对实验室进行紫外线消毒，并用 70%乙醇擦拭工作台和微量加样器。
9. 试剂盒各组分应在有效期内使用，不同批次的试剂盒成分不得混用。

【参考文献】

1. Botto, L.D. & Yang, Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *American journal of epidemiology* **151**, 862-877 (2000).
2. Wu, X. *et al.* Folate Metabolism Gene Polymorphisms MTHFR C677T and A1298C and Risk for Down Syndrome Offspring: A Meta-Analysis. *Obstetrical & Gynecological Survey* **68**, 555-556 (2013).
3. You, W. *et al.* MTHFR C677T and A1298C polymorphisms were associated with bladder cancer risk and disease progression: a meta-analysis. *DNA and cell biology* **32**, 260-267 (2013).
4. Teng, Z. *et al.* The 677C (rs1801133) Polymorphism in the MTHFR Gene Contributes to Colorectal Cancer Risk: A Meta-Analysis Based on 71 Research Studies. *PloS one* **8**, e55332 (2013).
5. 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.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：无锡锐奇基因生物科技有限公司

住所：无锡市滨湖区马山梅梁西路 88 号-A6

联系方式 电 话：0510-85998856
 传 真：0510-85998276
 网 址：www.riqigen.com

售后服务单位名称：无锡锐奇基因生物科技有限公司

联系方式 电 话：0510-85998856
 传 真：0510-85998276
 网 址：www.riqigen.com

生产地址：无锡市滨湖区马山梅梁西路 88 号一期 3 号楼第 3 层、GLP 楼第 5 层

生产许可证编号：苏食药监械生产许 20120026 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准 20183400118

【说明书核准日期及修改日期】

2018 年 4 月 2 日