

亚甲基四氢叶酸还原酶基因 677C/T 检测试剂盒（PCR-荧光探针法） 说明书

【产品名称】

通用名称：亚甲基四氢叶酸还原酶基因 677C/T 检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】24 人份/盒、48 人份/盒、96 人份/盒。

【预期用途】

本产品用于定性检测人 EDTA 抗凝全血中亚甲基四氢叶酸还原酶（MTHFR）基因 677C/T 多态性位点基因型。

使用分组的基因型指导临床进行高同型半胱氨酸血症患者的筛查，指导临床预测高同型半胱氨酸(Homocysteine, Hcy)血症患者服用“马来酸依那普利叶酸片”、叶酸或者其它含有叶酸的药品后降低 Hcy 作用效果，为个体化用药提供科学依据。

MTHFR 是同型半胱氨酸（Hcy）代谢途径中的关键酶，MTHFR 基因 677C/T 多态性有三个基因型，即 677CC 型（野生型）、677CT 型（杂合突变型）及 677TT 型（纯合突变型）。TT 基因型人群 Hcy 水平显著升高¹⁻³。大量流行病学和临床研究都证实 TT 基因型和高 Hcy 是脑卒中发生的独立危险因素⁴⁻⁷。

MTHFR 677 TT 基因型频率在我国不同民族人群存在较大差异，汉族 23.2%，朝鲜族 20.2%、回族 16.7%、蒙古族 16.2%、维吾尔族 9.0%、壮族 2.5%。其中壮族和维吾尔族 MTHFR 677 TT 基因型频率显著低于汉族。

【检验原理】

本品采用聚合酶链式反应和荧光法，检测 MTHFR 基因 677C/T 多态性位点的基因型。本品通过提取血样的全基因 DNA，借助荧光 PCR 技术进行检测，利用探针可与 DNA 模板特异性结合的特点，通过报告荧光的不同来分辨出样本的亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)的基因型。

【主要组成成分】

组成成分	主要成分	组成成分	主要成分
R1 沉淀液	氯化铵、碳酸氢钾、乙二醇四乙酸	R5 PCR 混合液	PCR 缓冲液、氯化镁、脱氧核苷三磷酸、Taq 聚合酶
R2 洗液	十二烷基硫酸钠、蛋白酶 K	R6 探针	引物、探针
R3 裂解液	乙酸铵、乙二醇四乙酸	R7 阳性对照	CC 型质粒、TT 型质粒
R4 稳定液	三羟甲基氨基甲烷、碳酸氢钾	R8 阴性对照	灭菌水

【储存条件及有效期】

本品-20℃以下贮存，且 R5 和 R6 应避光，有效期 12 个月（请于有效期内使用）。生产日期等内容见标签。

【适用仪器】

Applied Biosystems7300, 7500, 7500Fast, 7900HT, StepOne ;
Roche Applied Science LightCycler480 荧光 PCR 仪。

【样本要求】

- 1 样本为 EDTA 抗凝全血。
- 2 样本室温放置不超过 4 小时，4℃保存不超过 24 小时，-20℃保存不超过 6 个月，-80℃可长期保存。
- 3 样本禁止反复冻融。
- 4 样本采用泡沫箱加冰袋密封运输。

【检验方法】

建议在处理样本过程使用带滤芯的吸头，避免因移液器使用不当造成样本间交叉感染。

- 1 试剂预处理（前准备区）
使用时将 R1、R2、R3、R4 放置于室温充分融化，R5、R6、R7、R8 置于 4℃充分融化。
- 2 样本处理（样本处理区）
样本应置于室温充分融化。
注意：对照品无需处理；
- 2.1 取 25μL 全血样本放于 1.5mL 离心管内，加入 R1 150μL 振荡混匀，室温放置 5 分钟。将离心管移至离心机，14000rpm 离心 2 分钟，弃上清，保留沉淀。
- 2.2 加入 R2 150μL 于上述离心管内，振荡以确保沉淀悬浮起来，然后 14000 rpm 离心 1 分钟，弃上清，保留沉淀。沉淀颜色应为粉红色或透明状，如沉淀呈血红色或颜色较深，可重复步骤 2.2。
- 2.3 加入 R3 50μL，振荡以确保沉淀脱离管底，65℃水浴 5 分钟。（注：溶液中含有所需基因组 DNA）。
- 2.4 加入 R4 15μL 振荡混匀，短暂离心使溶液集中管底。选取 4μL 的 DNA 模板用于荧光定量 PCR，剩余样本可保存-20℃。
- 3 试剂配制（前准备区）
计算出所需要反应体系人份数 n（n=样本数+阴性对照数+阳性对照数），反应体系配制参照表 1。计算出各组份所需要用量，取出 R5、R6 短暂离心使溶液集中管底，取适当体积的 R5、R6 于离心管中，充分混匀后分装于 n 个 PCR 反应管中，每管加入 16μL。转移至样本处理区。

表 1

组分	每人份用	n 人份用量
R5	10μL	n×10μL
R6	0.25μL	n×0.25μL
双蒸水	5.75μL	n×5.75μL

- 4 加样（样本处理区）
向上述 PCR 反应管中分别加入 4μL 的阴性对照、阳性对照或待检样本 DNA，盖紧管盖，混匀并短暂离心。
- 5 PCR 扩增检测（PCR 扩增区）
将上述 PCR 反应管放入荧光定量 PCR 仪中扩增，程序设置如表 2。

表 2

序号	温度	时间	循环
1	50℃	2 分钟	1
2	95℃	2 分钟	1
3	95℃	15 秒	45
4	60℃	1 分钟	

荧光信号的收集定为 FAM 和 VIC，数据的采集定在 60℃。

【阳性判断值】

扩增反应完成后，通过收集得到的荧光信号进行检测结果分析。将 X 轴设定为 VIC 信号（代表基因型 C），Y 轴设定为 FAM 信号（代表基因型 T）。在基因分型图上，靠近原点处样品为 NTC；靠近 X 轴样品为 CC 基因型；靠近 Y 轴样品为 TT 基因型；靠近对角线位置样品为 CT 基因型。在结果分析报告中，call 选项下可见检测结果为 CC 型（Allele X）、TT 型（Allele Y）或 CT 型（Both），Quality 或 Score 选项下可见该次检测评分情况。

质控标准：1. 阴性对照品应靠近原点附近；2. 阳性对照品应位于中线附近；

如果上述条件之一不符，建议按照【检验方法】项重新检测。

【检验结果的解释】

- 1 位置靠近 X 轴，结果判读为 CC 型且 Quality $\geq$ 0.9，样品为 CC 型（突变阴性）；
- 2 位置靠近 Y 轴，结果判读为 TT 型且 Quality $\geq$ 0.9，样品为 TT 型（突变阳性）；
- 3 位置靠近中线附近，结果判读为 CT 型且 Quality $\geq$ 0.9，样品为 CT 型（突变阳性）；
- 4 结果判读为 Undetermined 或 Quality $<$ 0.9，样品基因型无法判断，样品需重新检测。需重新检测样本按照【检验方法】项步骤重复检测。

【检验方法的局限性】

- 1 因肝素对本品检测结果有干扰，因此不能用于检测肝素抗凝血样。
- 2 样本检测结果与样本收集、处理、运送及保存质量有关，不能满足存放要求的样品可能导致检测结果阴性。
- 3 该方法为定性检测，不能用于定量分析。
- 4 不能直接作为临床确诊依据，仅供临床参考使用。

【产品性能指标】

- 1 最低检测限：检测限度为 200pg/ μ L。
- 2 阳性参考品符合率：10 份阳性参考品，均为突变阳性。
- 3 阴性参考品符合率：10 份阴性参考品，均为突变阴性。
- 4 重复性：同一参考品重复检测 10 次，基因型结果与预期相符。
- 5 本试剂盒对 MTHFR 基因除 677C/T 外其它突变位点如 1298A/C 等无非特异扩增。
- 6 全血样本中含有不超过 5g/L 血红蛋白、0.4g/L 胆红素、15g/L 甘油三酯、0.4g/L 抗坏血酸等内源性抑制物质时，对本试剂盒的检测结果无干扰。
- 7 通过向全血样本中添加 2.5 倍治疗水平浓度的常用高血压药物，如氨氯地平（络活喜），硝苯地平控释片（拜心同）、马来酸依那普利叶酸片（依叶）等，研究结果显示该药物对

本品检测结果无干扰。

【注意事项】

- 1 使用前请仔细阅读产品说明书，并严格按照说明书要求操作。
- 2 本品仅用于体外检测。
- 3 试剂开瓶后，应按规定的贮存条件保存，并在有效期内使用。
- 4 不同批号试剂不要混合使用，各区物品均为专用，不得交叉使用。
- 5 实验中使用过的吸头、血样保存管等废弃物处理，应符合基因扩增检验实验室管理规定。
- 6 实验室管理应严格符合行业行政主管部门颁布的有关基因扩增检验实验室的管理规定。

【参考文献】

- 1) Tanaka T, Scheet P, Giusti B, et al. Genome-wide association study of vitamin B6, vitamin B12, folate, and homocysteine blood concentrations. Am J Hum Genet. 2009; 84(4):477-82.
- 2) Holmes MV, Newcombe P, 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 randomised trials. Lancet. 2011; 378(9791):584-94.
- 3) 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. Nutr J. 2012; 11:2.
- 4) Casas JP, Bautista LE, Smeeth L, et al. Homocysteine and stroke: evidence on a causal link from mendelian randomisation. Lancet. 2005; 365(9455):224-32.
- 5) 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. Cerebrovasc Dis. 2008; 26(1):48-62.
- 6) Wald DS, Wald NJ, Morris JK, et al. Folic acid, homocysteine, and cardiovascular disease: judging causality in the face of inconclusive trial evidence. BMJ. 2006; 333(7578):1114-17.
- 7) 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. JAMA. 2015; 313(13):1325-35.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：深圳泰乐德医疗有限公司

住所：深圳市南山区粤海街道高新中一道 16 号生物孵化器三期 3 号楼二楼东侧及四楼、2 号楼四楼东侧

联系方式：0755-2603 1326 0755-86142034

售后服务单位名称：深圳泰乐德医疗有限公司 联系方式：0755-2603 1326 0755-86142034

生产地址：深圳市南山区高新区中区高新中一道 16 号 2 号楼（二楼东侧、四楼东侧）、3 号楼（一楼西侧、二楼东侧、四楼东侧）

生产许可证编号：粤食药监械生产许 20101824 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】：国械注准 20153401296

【说明书核准日期及修改日期】：2015 年 7 月 28 日核准，2017 年 4 月 19 日、2018 年 01 月 03 日、2018 年 03 月 30 日、2019 年 05 月 06 日、2019 年 08 月 28、2022 年 11 月 17 日修改