

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】

32 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人 EDTA 抗凝全血样本中亚甲基四氢叶酸还原酶（MTHFR）基因 C677T 位点的多态性。

亚甲基四氢叶酸还原酶（MTHFR）基因 C677T 位点的多态性有野生型（CC）、杂合突变型（CT）及纯合突变型（TT）三种基因型。叶酸是参加体内核酸合成、蛋白质代谢、胚胎发育等生理过程的物质，属于 B 族维生素。亚甲基四氢叶酸还原酶（MTHFR）是人体内叶酸-甲硫氨酸代谢途径中的关键酶，MTHFR 基因突变影响酶活，使叶酸代谢出现障碍，导致叶酸水平降低以及血浆中同型半胱氨酸（Homocysteine, Hcy）水平升高，从而可能引发心脑血管病、胎儿神经系统发育畸形和不良妊娠结局等一系列疾病。研究表明，MTHFR 基因 C677T 位点突变是影响酶活的重要因素，会直接导致 MTHFR 活性和热稳定性下降，是亚洲人群中影响血浆中 Hcy 含量最常见的一个遗传决定因素。

本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对预期或正在服用叶酸的高同型半胱氨酸血症患者进行叶酸的用药指导。临床医生在实际临床应用时需结合病例的具体情况进行判断，不能以本试剂盒检测结果作为临床诊断的唯一依据。

【检验原理】

本试剂盒采用实时荧光定量 PCR 技术，针对人亚甲基四氢叶酸还原酶（MTHFR）基因的 C677T 位点所在基因组位置设计一对 PCR 扩增引物和两条检测探针，两条探针分别为完全匹配 MTHFR 677T 碱基突变序列的突变型探针（FAM 标记）和完全匹配 MTHFR 677C 碱基野生序列的野生型探针（HEX 标记）。引物特异扩增包含 C677T 位点的核酸片段，同时探针与对应型别的核酸序列退火，在 Taq 酶外切酶活性作用下探针发生水解产生荧光信号，得到实时扩增曲线，最后通过数据分析获取的 FAM 通道 677T 探针和 HEX/VIC 通道 677C 探针 Ct 值进行该位点基因型判断。

【主要组成成分】

本试剂盒由以下三个组分组成：

组分名称	主要组成成分	规格	数量	管盖颜色
MTHFR677 PCR 反应液	引物、探针、dNTP、Taq 酶、UDG	610μL/管	1 管	绿色
MTHFR677 阳性对照	质粒	48μL/管	1 管	黄色
空白对照	超纯水	96μL/管	1 管	本色

注：不同批号试剂盒中的各组分不可以互换。

本试剂盒不包含核酸提取或纯化试剂，推荐采用广州美基生物科技有限公司的核酸提取或纯化试剂（备案号：粤穗械备 20150062 号）。

【储存条件及有效期】

- ≤-15℃避光保存，有效期为 12 个月。
- 试剂盒开盖后可在 2~8℃避光保存不超过 2 周。
- 试剂盒在使用时应尽量避免反复冻融，开封前冻融不超过 5 次。
- 本试剂盒可采用泡沫箱加干冰或冰袋密封运输。干冰运输开箱温度应低于 0℃，运输时间不超过 7 天；冰袋运输开箱温度应低于 30℃，运输时间不超过 4 天。
- 生产日期及使用期限详见产品标签。

【适用仪器】

ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪、宏石 SLAN-96P 全自动医用 PCR 分析系统。

【样本要求】

- 适用样本类型为 人 EDTA 抗凝全血样本，不能使用肝素抗凝。

- DNA 提取：按推荐的核酸提取或纯化试剂说明书进行样本的 DNA 提取。
- 样本保存：血液标本采集后，应尽量于当日进行 DNA 提取，如需保存，室温保存温度不高于 26℃且时长不超过 48h，2~8℃保存不应超过两周，-20±5℃保存不应超过两年，-70℃或以下可保存 4 年。避免反复冻融。提取的 DNA 样本建议尽快进行检测，如需保存，在 2~8℃保存不应超过一个月，-20±5℃保存不应超过三年，-70℃或以下可保存 4 年。避免反复冻融。
- 样本运输：全血样本可采用泡沫箱加冰袋运输，运输过程温度不高于 0℃，运输时长不超过 3 天。

【检验方法】

1. 样本处理

取 200μL 待检样本到 1.5mL 离心管中，按照广州美基生物科技有限公司的核酸提取或纯化试剂（备案号：粤穗械备 20150062 号）的说明书进行核酸提取，建议加入洗脱液体积为 100μL。

2. PCR 反应液准备（在试剂准备区进行）

- 从试剂盒中取出 MTHFR677 PCR 反应液，室温避光放置，充分解冻后瞬时离心，涡旋混匀，再次瞬时离心使液体聚集管底；
- 根据所需测定的反应数量，按 18μL/反应分装至 PCR 反应孔中；
- 剩余试剂应立即放回冰箱避光保存。

3. 加样（在标本制备区进行）

- 取出 MTHFR677 阳性对照和空白对照，解冻后瞬时离心，涡旋混匀，再次瞬时离心使液体聚集管底备用；
- 在分装好的 PCR 反应孔中分别加入 2μL 待测 DNA 样本、MTHFR677 阳性对照和空白对照，反应总体积 20μL；
- 盖好 PCR 反应管盖，瞬时离心使所有液体集中到反应管底部，移至扩增区上机检测。

4. PCR 扩增（在扩增区进行）

将 PCR 反应管放入荧光定量 PCR 仪器中，使用宏石 SLAN-96P 时，选择模块控温，677T 选取 FAM 通道，677C 选取 HEX 通道；使用 ABI 7500 时，无需选择控温方式，探针模式设置为 677T Reporter Dye: FAM, Quencher Dye: None; 677C Reporter Dye: VIC, Quencher Dye: None, Passive Reference: None。按下表设置反应条件进行 PCR 扩增：

步骤	温度	时间	循环数
1	37℃	5 分钟	1
2	95℃	10 分钟	1
3	95℃	10 秒	40
	60℃	1 分钟（采集荧光）	

5. 结果获取

- 扩增曲线特征的描述：扩增曲线一般呈 S 型；
- 基线设定：可选择自动基线，也可手动调整基线。基线调整原则：起点应避开荧光采集起始阶段的信号波动，可选择 3~7 之间，一般情况可选择 6；基线终点比最早出现指数扩增的样本起峰位置减少 2~3 个循环，可选择 15~20 之间，一般情况选择 18，若存在高浓度样本起峰早于 15，则根据最高浓度样本情况设定；
- 阈值设定：以高于所有噪音线且略高于正常空白对照扩增曲线（无规则的噪音线）的最高点作为阈值，即空白对照“NoCt”或“Undetermined”为准；
- 结果分析：设定好基线和阈值后，即可进行结果分析获取 Ct 值。选择 FAM 通道即为 677T 的检测结果，HEX/VIC 通道即为 677C 的检测结果。

6. 质量控制程序

- 空白对照：用以监控是否存在污染，检测结果应为 FAM 通道和 HEX/VIC 通道均无明显扩增曲线，无 Ct 值；
- MTHFR677 阳性对照：用以监控试剂、操作和程序的有效性，检测结果应为 FAM 通道和 HEX/VIC 通道有扩增曲线且均 Ct≤31；

注：以上要求必须在同一次实验中同时满足，否则检测结果视为无效，应重新检测。

【阳性判断值】

按下表根据检测结果 Ct 值进行判断：

通道（探针）	Ct 值
--------	------

FAM 通道（677T 突变型探针）	≤34
HEX/VIC 通道（677C 野生型探针）	≤34

【检验结果的解释】

- 当空白对照不满足要求时，说明试剂或环境可能存在污染，应清除污染后重复实验。
- 当 MTHFR677 阳性对照不满足要求时，说明可能存在试剂失效或其他原因，应做进一步分析后重复实验。
- 当空白对照和 MTHFR677 阳性对照满足要求时，根据两条探针的 Ct 值判断样本类型：
 - FAM 通道探针 Ct>34 或无 Ct 值、HEX/VIC 通道探针 Ct≤34 时，MTHFR 基因 C677T 位点检测结果为野生型（CC）；
 - FAM 通道探针 Ct≤34、HEX/VIC 通道探针 Ct≤34 时，MTHFR 基因 C677T 位点检测结果为杂合突变型（CT）；
 - FAM 通道探针 Ct≤34、HEX/VIC 通道探针 Ct>34 或无 Ct 值时，MTHFR 基因 C677T 位点检测结果为纯合突变型（TT）；
 - FAM 通道探针 Ct>34 或无 Ct 值、HEX/VIC 通道探针 Ct>34 或无 Ct 值时，说明可能样本浓度低、存在 PCR 抑制反应或为非人源 DNA，判读该次检测未检出相应基因型别，应重复检测；如果重复检测结果情况相同，应重复提取样本后再检测。

【检验方法的局限性】

- 本试剂盒检测结果仅用于疾病的辅助检测，不作为疾病诊断的唯一依据。
- 不合理的样本采集、运输和处理，以及不当的试验操作和试验环境均有可能导致错误的检测结果。
- 当检测结果为野生型（CC）时，不排除被检测者带有其他 MTHFR 基因位点突变类型。

【产品性能指标】

- 准确性：检测 9 份企业准确性参考品（P1~P9），结果应为相应基因型别。
- 特异性：检测 4 份企业特异性参考品（N4~N7），结果应为相应基因型别或未检出相应基因型别。
- 最低检测限：检测 3 份浓度不高于 1ng/μL 的最低检测限参考品（S1~S3），结果应为相应基因型别。本试剂盒最低检测限为 1ng/μL。
- 重复性：检测 2 份重复性参考品（J1 和 J2），重复 10 次，结果均应为相应基因型别，且相应检测通道 Ct 值的变异系数 CV（%）应不高于 5.0%。
- 精密度：选择中、低以及最低检测限水平 3 个浓度的 MTHFR 基因 C677T 位点杂合突变型（CT）临床样本，对重复性和实验室内精密度进行研究，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，结果显示所有检测结果均为 CT 型，且 677C 与 677T 的 Ct 值批内不精密度和批间不精密度变异系数(CV 值)均小于 5.0%；对实验室间精密度进行研究，均采用 3 批产品进行检测，在 3 个实验室分别由 3 名实验员每次试验每例样本重复检测 5 次，连续检测 5 天，结果显示所有检测结果均为 CT 型，且 677C 与 677T 的 Ct 值实验室间不精密度变异系数(CV 值)均小于 5.0%。
- 分析特异性：干扰实验显示血液中添加血红蛋白（终浓度 2.5g/L）、甘油三酯（终浓度 22.6mmol/L）、胆红素（终浓度 513μmol/L）EDTA（终浓度 6mg/mL）、叶酸（终浓度 6mg/mL）、维生素 B12（终浓度 100μg/L）、氢氯噻嗪（终浓度 50mg/L）、硝苯地平（终浓度 30mg/L）、阿托伐他汀（终浓度 40mg/L）、非诺贝特（终浓度 50mg/L）不会对本试剂盒检测结果造成干扰；交叉反应实验表明与检测位点序列相似或相近的 MTHFR A1298C 位点和 MTRR A66G 位点基因序列以及人源性核酸大肠杆菌和枯草芽孢杆菌 DNA 也不会对本试剂盒产生交叉反应。
- 临床试验结果：本试剂盒在 4 家临床试验机构进行临床研究，共入组 740 例有效样本，使用同类已上市产品作为对比方法，其中纯合突变型的符合率为 100%[95%CI: 98.28% ~ 100.00%]，杂合突变型的符合率为 100%[95%CI: 98.80% ~ 100.00%]，野生型的符合率为 100%[95%CI: 98.17% ~ 100.00%]，总符合率为 100%[95%CI: 99.74% ~ 100.00%]。

【注意事项】

- 本试剂盒仅供体外诊断使用。
- 本试剂盒的使用者应该是接受过 PCR 技术训练的试验者。
- 实验前请仔细阅读本说明书，并严格按照说明书要求进行操作。
- 所有化学药品都具有潜在危险性，血液样本应视为潜在的感染源，操作时应注意防护，并且废弃物处理均需符合相关法规要求。
- 临床实验室应按照卫生部的《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》配备设备及操作人员。
- 实验过程严格分区，即.试剂准备区、标本处理区、扩增区，各区实验服、手套和帽子等不能带入其它区域，各区仪器设备不能带入其它区域。
- MTHFR677 PCR 反应液中含对光敏感的荧光素标记探针，在试验过程中常规光条件下并不会影响试验结果，但应避免将之暴露于

不必要的强光下。

- 实验全过程必须戴一次性手套。
- 建议使用无菌带滤芯吸头，实验中废弃的吸头应弃于含 10%次氯酸的废液缸中。
- 实验完毕用 10%次氯酸或 75%酒精清理实验工作台及移液器等相关物品，并用紫外灯照射。
- 随意替换试剂盒中的任何试剂，都可能影响使用效果，不同批号试剂不能组合混用，请勿使用过期产品。

【标识的解释】

符号	
含义	体外诊断医疗器械

【参考文献】

- [1]Moll S, Varga EA. Homocysteine and MTHFR Mutations. Circulation. 2015;132(1):e6-e9.
- [2]Gohil R, Peck G, Sharma P. The genetics of venous thromboembolism. A meta-analysis involving approximately 120,000 cases and 180,000 controls. Thromb Haemost. 2009;102(2):360-370.
- [3]陈磊, 常荣. 亚甲基四氢叶酸还原酶 C677T 基因多态性的研究进展[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2016, 008(001):113-115.
- [4]李建平, 卢新政, 霍勇,等. H 型高血压诊断与治疗专家共识[J]. 中华高血压杂志, 2016, 024(002):123-127.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：广东辉锦创兴生物医学科技有限公司

住所：佛山市顺德区龙江镇东涌社区居民委员会人民西路 68 号新基国际创意园 C 座 201

联系方式：0757-29266029

售后服务单位名称：广东辉锦创兴生物医学科技有限公司

联系方式：0757-29266029

生产地址：佛山市顺德区龙江镇东涌社区居民委员会人民西路 68 号新基国际创意园 C 座 201、A 座 202

生产许可证编号：粤药监械生产许 20245525 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准 20253402180

【说明书批准日期/生效日期及修改日期】

2025 年 10 月 30 日