دفترچه راهنما

کیفی سنجش و شناسایی کیت

جهش‌های C677T و A1298C ژن MTHFR با

روشReal-Time PCR

Senmuv MTHFR PCR kit

Doc. #: IFU-MTHFR Doc. Version: 02 Revision Date: 05-23-2023

فهرست مطالب

شماره رفرانس ۳
شرح کیت ۳
اصول ۳
مقدمه ۳
محتویات کیت ۴
نگهداری و انتقال کیت ۴
نکات احتیاط عمومی ۵
هشدارها و محدودیت‌ها ۶
نمونه‌گیری و نگهداری ۷
عوامل تداخلی ۷
آماده سازی ۸
اضافه کردن الگو ۸
برنامه ریزی دمایی ۹
آنالیز نتایج ۱۱
حساسیت و اختصاصیت آنالیتیکال ۱۳
نکات آنالیز نتایج در دستگاه‌های مختلف ۱۳
نشانه ها ۱۴
اطلاعات تماس ۱۴

شماره رفرانس

- BONMTHFR-24

شرح کیت

این کیت بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به صورت Real-Time ساخته شده است. این محصول برای تشخیص جهش‌های نقطه‌ای C677T و A1298C ژن MTHFR در شرایط آزمایشگاهی تهیه شده و نتایج تشخیصی به‌دست‌آمده توسط این محصول باید همراه با سایر داده‌های بالینی یا آزمایشگاهی تفسیر شوند.

اصول

تشخیص پاتوژن توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بر اساس تکثیر مناطق خاص ژنوم انسان میباشد. در واکنش Real-Time PCR محصول تکثیر شده از طریق فلوروسنت شناسایی می‌شوند. مشاهده شدت فلوروسنت در حین واکنش PCR (به صورت Real-Time) تشخیص محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به بازکردن مجدد لولههای واکنش پس از اجرای PCR ممکن می‌سازد. این کیت در قالب یک پلتفرم دو لوله ای مولتی پلکس شامل دو ست پرایمر و پروب طراحی شده است که قادر به تشخیص همزمان افتراقی دو الل سالم و بیمار برای دو جهش ژن MTHFR (C677T) و (A1298C به ترتیب با فلوروفورهای HEX و FAMمی باشد.

مقدمه

آنزیم متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز (MTHFR) یکی از اجزای اصلی متابولیسم اسید فولیک و سنتز هموسیستئین است که توسط ژن MTHFR کد می‌شود. بروز تغییرات ژنتیکی در این ژن ممکن است باعث تغییر و تبادل اسیدهای آمینه شده و بر فعالیت آنزیم تاثیر بگذارد. کاهش فعالیت این آنزیم منجر به تغییراتی در سنتز متیونین از هموسیستئین می‌شود. با توجه به این که تجمع هموسیستئین ممکن است باعث بیماری‌های مختلفی از جمله ترومبوز، تصلب شرایین و نقص لوله‌ی عصبی در دوران جنینی شود، شناسایی جهش‌ها و تغییرات ژنتیکی در ژن MTHFR از اهمیت فراوانی برخوردار است.شایع‌ترین جهش‌های نقطه‌ای در ژن MTHFR در جایگاه‌های ۶۷۷ و ۱۲۹۸ این ژن واقع شده‌اند که به ترتیب شامل جایگزینی نوکلئوتیدهای C به T و A به C می‌باشند.

جهش C677T باعث تبدیل آمینواسید آلانین به آمینواسید والین در جایگاه ۲۲۳ توالی پروتئینی آنزیم می‌شود و فعالیت آن در افراد با ژنوتیپ هموزیگوت بیمار ((TT، ۵۰ تا ۶۵ درصد کاهش می‌یابد. همچنین جهش A1298C سبب جابه جایی آمینواسید گلوتامیک‌اسید و آلانین می‌شود و اگرچه نسبت به جهش

C677T فعالیت آنزیم را به میزان کمتری تحت تاثیر قرار می‌دهد (حدود ۱۵ تا ۳۰ درصد)، اما این جایگزینی نیز با ترومبوز و احتمال سقط جنین در ارتباط است.

محتویات کیت

Title	24 Tests
	Volume per Vial
Wild type Master Mix	360 µl/tube × 1
Mutant type Master Mix	360 µl/tube × 1
Positive Control	50 µl/tube × 1

نگهداری و انتقال کیت

- ✓ کلیه محتویات این کیت باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداریگردد، همچنین به منظور انتقال و جابهجایی کیت از یونولیت با درب و یخخشک استفاده نمایید.
- ✓ نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هیچگاه نباید بیشتر از یکساعت شود.
- ✓ این کیت نیاز به حمل برروی بستههای یخزده (Frozen Ice Pack) را دارد.
- ✓ همه مواد موجود در کیت تا تاریخ انقضا، همان‌طور که روی برچسب بستهبندی محصول مشخص شده است، در شرایط مشخص شده پایدار هستند.
- ✓ از چرخههای متعدد ذوب و انجماد (Freeze-Thaw) خودداری کنید زیرا سبب کاهش حساسیت و درنتیجه عدم کارایی کیت می‌شود.
- ✓ از قراردادن مستقیم اجزای کیت در معرض نور، گرما یا رطوبت خودداری کنید.
- ✓ معرفها را قبل از استفاده در دمای اتاق (۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) ذوب کنید. پس از ذوب شدن مواد موجود در کیت، لولهها را به طور مختصر سانتریفیوژ کنید تا مطمئن شوید که مواد موجود در کیت به طور یکنواخت مخلوط شدهاند.

مواد و تجهیزات مورد نیاز که باید توسط کاربر تدارک دیده شود:

۱. کیت استخراج DNA
۲. سمپلر قابل تنظیم در اندازههای مختلف و نوك سمپلر فیلتردار
۳. سانتریفوژ رومیزي
٤. بلوك خنك كننده
٥. وایتکس ۱۰ درصد
٦. گان و دستکش
۷. دستگاه با قابلیت خوانش در کانال Green و Yellow
۸. نرمافزار دستگاههای مورد استفاده
۹. استریپ و کپ مناسب دستگاه مورد استفاده

نکات احتیاط عمومی

۱. لطفاً دستورالعمل را با دقت بخوانید و قبل از استفاده محصول با تمام اجزای کیت آشنا شوید و درحین کار دستورالعمل را دقیقاً دنبال کنید.
✓ لطفاً قبل از استفاده، ابزارهای Real-Time PCR سازگار را بررسی کنید و فرآیند را با آنها جلو ببرید.
✓ از کیت یا اجزای کیت پس از تاریخ انقضا استفاده نکنید.
✓ در کیت آزمایش از ماده دیگری استفاده نکنید.
۲. از سرسمپلرهای فیلتردار وRNase & DNase free استفاده کنید.
۳. نگهداری و تخلیص مواد مثبت برای نمونه های گرفته شده از بیمار، کنترلها و محصولات حاصل از PCR باید در محلی کاملا جدا از محل نگهداری و آماده سازی MasterMix صورت پذیرد.
٤. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طورکامل در دمای اتاق ذوب شود.
٥. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد را به خوبی پیپتاژ نمایید و بهطور مختصر اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به طورکامل توصیه میشود.
٦. تمام مراحل مربوط به تهیه MasterMix باید بر روی یخ یا جعبههای سرد(Cooling Box) انجام شود. استوک اصلی مربوط به Master Mix بعد از برداشتن مقدار مورد نیاز از آن باید به سرعت به فریزر منتقل شود.
۷. هنگام کار با مواد شیمیائي، روپوش مناسب آزمایشگاهي، دستکش یکبار مصرف، وعینکهاي محافظ داشته باشید.

۸. کیت حاوی کنترل مثبت است. برای جلوگیری از آلودگی که ممکن است باعث ایجاد مثبت کاذب شود، کنترل مثبت را از سایر مواد موجود در کیت کاملا جدا کنید.
۹. PCR بسیار حساس به آلودگی متقابل است، پس فرآیند کار را با دقت انجام دهید.
۱۰. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت، برای جلوگیری از آلودگی، دستکش‌ها باید مرتباً تعویض شوند.
۱۱. از تیپ‌های جداگانه و اختصاصی استفاده کنید. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت از میکروتیپ‌های فیلتردار برای جلوگیری از ورود آلودگی DNA استفاده کنید.
۱۲. لطفاً لوله‌های PCR را پس از امپلیفای باز نکنید.
۱۳. از استفاده ی مجدد مواد یکبار مصرف بپرهیزید.
۱٤. مواد موجود درکیت که بلا استفاده شدند، کیت استفاده شده و زباله‌ها باید به درستی دور انداخته شوند.
۱۵. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیپت‌ها و تجهیزات را با اسپری اتانول ۷۵٪ و وایتکس ۱۰٪ تمیز کنید.

هشدارها و محدودیت‌ها

۱. تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP[1] توسط پرسنل آموزش دیده دارای پوشش حرفه ای و محافظ (PPE)[2] انجام شود. آزمایش‌های بالینی بر نمونه‌های عفونی باید در هود کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط ۲-BSL انجام شود. (استفاده از دستورالعمل: Interim Laboratory Biosafety Guideline For Handling and Processing Specimen Associated)
۲. پیشنهاد می‌شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد از کار با وایتکس ۱۰ درصد تمیز شود و همینطور بعد از کار لامپ UV زده شود.
۳. پیشنهاد می‌شود محل استخراج DNA، آماده‌سازی مخلوط واکنش از فضای آماده‌سازی و اضافه کردن نمونه و نمونه کنترل مثبت جدا باشند زیرا ممکن است نتایج کاذب به وجود آید.
٤. پس از آماده‌سازی مخلوط واکنش، آن را در تاریکی نگهداری نمایید.

کنترل‌ها

۱. نمونه بیمار: از محتویات اسید نوکلئیک حاصل از استخراج DNA استفاده شود.
۲. کنترل منفی (NTC): همواره یک نمونه کنترل منفی حاوی آب بجای نمونه استفاده شود.
۳. کنترل مثبت (PTC): از کنترل مثبت کیت به‌جای نمونه در یک واکنش استفاده شود.

[1] Good Laboratoty Practice
[2] Personal Protective Equipment

نمونه‌گیری و نگهداری

نمونه مورد نیاز می‌تواند از سلول‌های بافتی نظیر خون استخراج گردد.

نمونه‌گیری باید در شرایط استریل صورت گیرد.

نگهداری نمونه‌های گرفته شده

۱. از ظرف های مخصوص و یکبار مصرف برای جمع آوری نمونه استفاده کنید.

۲. برای جمع‌آوری خون یا پلاسما، از لوله‌های استریل حاوی مواد ضدانعقادی مانند EDTA یا سیترات استفاده کنید. توجه داشته باشید که نمونه‌های حاوی هپارین به دلیل اثر مهاری این ماده برای PCR مناسب نیستند.

۳. طی چند ساعت اولیه پس از خون‌گیری، سرم یا پلاسما را جدا و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- ℃ نگهداری کنید. سایر نمونه‌های مورد استفاده را نیز طی چند ساعت اولیه پس از نمونه‌گیری در دمای ۲۰- ℃ نگهداری و از فریز و ذوب کردن مکرر آن‌ها خودداری نمایید.

٤. در صورت حمل و نقل نمونه، نمونه را در شرایط سرد و همراه یخ منتقل کنید.

٥. در صورت نبود شرایط برای انتقال نمونه در ٢٤ ساعت اولیه، نمونه را در ۲۰- ℃ فریز نمایید.

تاریخ انقضای کیت

تاریخ انقضای کیت بر روی جعبه محصول درج شده است.

کنترل داخلی (Internal Control)

در این کیت، هر یک از الل‌ها به عنوان کنترل داخلی عمل می‌کنند. کنترل داخلی به کاربر این امکان را می‌دهد که فرآیند تخلیص و احتمال وجود مواد مهارکننده PCR را بررسی نماید.

عوامل تداخلی

(HCl (1N ،EDTA (0.5M)، دانه‌های سیلیس (1μl)، خون (1μl)، اوره (٤٠ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) و بافر لیز عملکرد آزمایش را مهار میکنند. وجود مهارکننده در واکنش با ژن کنترل داخلی قابل ردیابی است.

خالص‌سازی نوکلئیک اسید

جداسازی اسید نوکلئیک باید توسط کیت‌های جداسازی موجود در بازار مطابق پروتکل‌های جداسازی مواد بالینی خاص انجام شود. کیت استخراج DNA در این کیت گنجانده نشده است.

آماده سازی

این کیت حاوی دو میکس است. میکس Wild جهت شناسایی الل‌های سالم، و میکس Mutant جهت شناسایی الل‌های جهش یافته‌ی ژن MTHFR می‌باشند.

۱. ابتدا لوله‌ها را روی رک یخ بگذارید تا محتویات آن‌ها ذوب شوند و لوله‌های بافر واکنش و پرایمر پروب را به آرامی ورتکس کنید و به طور مختصر سانتریفیوژ کنید.

۲. برای هر نمونه ۲ لوله در نظر بگیرید. میزان ۱۵ میکرولیتر از Wild type Master Mix را به ۱ لوله و ۱۵ میکرولیتر از Mutant type Master Mix را به لوله دیگر PCR اضافه کنید.

نکته در هر بار انجام تست یک لوله به‌عنوان NTC (No Template Control) باید گذاشته شود. در NTC به‌جای نمونه استخراج شده از آب استفاده می‌شود که برای کنترل آلودگی واکنش کاربرد دارد.

اضافه کردن الگو

پس از آماده سازی محلول‌ها و انتقال آن به تیوب‌های واکنش، ابتدا نمونه کنترل منفی (NTC) را آماده کنید. برای این کار، ۵ میکرولیتر از آب بدون نوکلئاز را به تیوب کنترل منفی اضافه نمایید. پس از انتقال به منطقه کار با اسید نوکلئیک، ۵ میکرولیتر از نمونه‌های تحت تست را به تیوب‌های مربوطه اضافه نمایید. سپس تیوب‌ها را در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده و نمونه‌ها را نام‌گذاری کنید.

Reaction Setup	Volume
Master Mix	15 μl
Sample or Control	5 μl
Final Volume	20 μl

برنامه ریزی دمایی

دستورالعمل برای دستگاه‌های Real-Time PCR دارای کانال Green و Yellowتوصیف شده است. پس از تنظیم کردن دستگاه مطابق برنامه زیر، واکنش را راه اندازی کنید. برای آگاهی از نحوه تعریف کانال در دستگاه Rotor Gene به کاتالوگ دستگاه مراجعه کنید. مقادیر دمایی هر قسمت در جدول زیر آورده شده است.

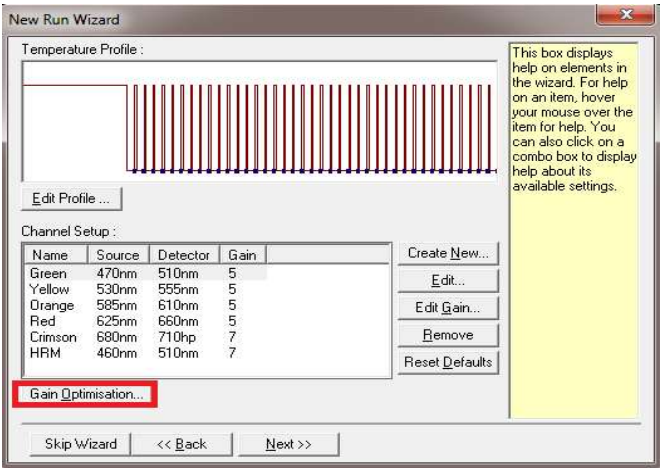
	Temperature	Hold	Cycle
Pre-Denaturation	95 ℃	4 min	1
Denaturation	95 ℃	15 sec	35
Annealing and Acquisition on Channel Green and Yellow	60 ℃	45 sec	

علاوه بر تعریف دمایی دستگاه که در قسمت بالا آمده است دستگاه باید برای طیف سنجش فلورسنت نیز تنظیمگردد. اندازه‌گیری تابش فلورسانس باید برای رنگ Green وYellow تنظیم شود.

تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه‌های مختلف:

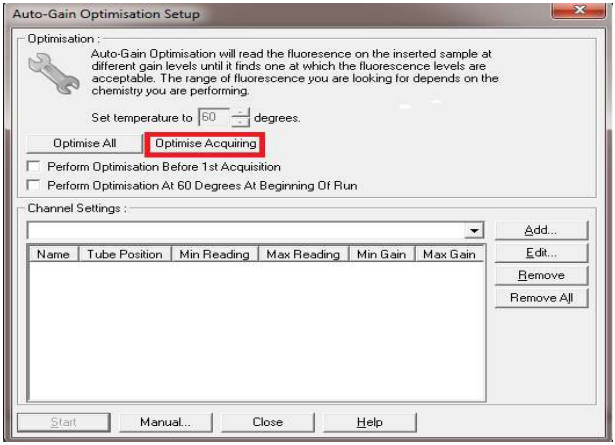
دستگاه : Rotor-Gene

بدین منظور در دستگاه Rotor-gene گزینه ی Gain Optimization را انتخاب کنید (شکل ۱).

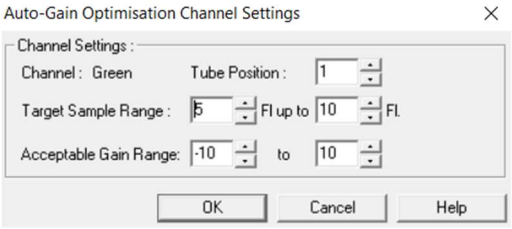


شکل ۱. تنظیمات دستگاه

در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی Optimise Acquiring برای کانال Green و Yellow بازه ی Target sample range از ۵ تا ۱۰ (حالت پیش فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل ۲). همچنین Gain دستگاه باید برمبنای تیوب عدد نوشته شده در کادر Tube Position صحیح انتخاب شده باشد (شکل ۳).

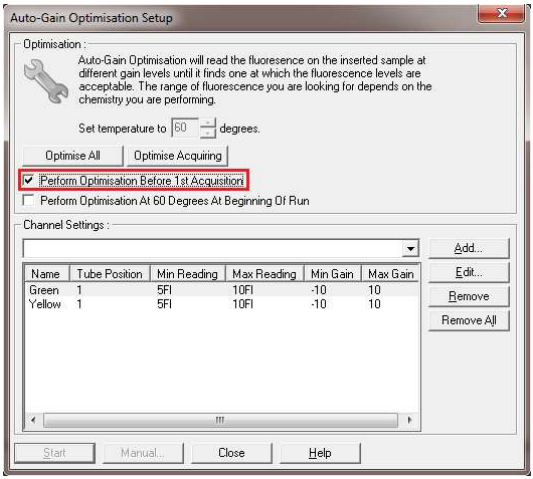


شکل ۲. تنظیمات دستگاه



شکل ۳. تنظیمات دستگاه

پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌ی Perform Optimization Before 1st Acquisation را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید (شکل ٤).



شکل ٤. تنظیمات دستگاه

آنالیز نتایج

آنالیز نتایج توسط نرم افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در کانال رنگی سبز و زرد، آستانه را روی گزینه‌ی Auto قرار دهید.

آنالیز نتایج بر اساس محاسبه‌ی اختلاف Ct بین دو لوله‌ی wild و mutant انجام می‌شود.

۱. چنانچه نمونه در کانال زرد دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد:

الف: اگر لوله‌ی wild حداقل 2 واحد Ct کمتر از لوله‌ی mutant باشد، فرد برای جهش C677T هموزیگوت سالم است.

ب: اگر لوله‌ی mutant حداقل 2 واحد Ct کمتر از لوله‌ی wild باشد، فرد برای جهش C677T هموزیگوت بیمار است.

ج: اگر اختلاف Ct بین دو لوله سالم و بیمار کمتر از 2 واحد باشد، فرد برای جهش C677T هتروزیگوت است.

۲. چنانچه نمونه در کانال سبز دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد:

الف: اگر لوله‌ی wild حداقل 2 واحد Ct کمتر از لوله‌ی mutant باشد، فرد برای جهش A1298C هموزیگوت سالم است.

ب: اگر لوله‌ی mutant حداقل 2 واحد Ct کمتر از لوله‌ی wild باشد، فرد برای جهش A1298C هموزیگوت بیمار است.

ج: اگر اختلاف Ct بین دو لوله سالم و بیمار کمتر از ۲ واحد باشد، فرد برای جهش A1298C هتروزیگوت است.

از آنجا که هر فرد یکی از آلل‌های نرمال و یا جهش یافته و یا هر دوی آنها را دارا می باشد، بنابراین همیشه نتیجه آزمایش باید حداقل برای یکی از انواع نرمال یا جهش یافته مثبت باشد. بنابراین، این آلل ها در واقع به عنوان کنترل داخلی ایفای نقش می کنند. در صورتی که برای نمونه ای، سیگنالی در کانال زرد و یا سبز دیده نشود و یا منحنی مربوط به آنها سیگموئیدی نباشد، آزمایش نامعتبر بوده و باید دوباره تکرار شود.

جدول تفسیر نتایج

Chanel	Wild Mix	Mutant Mix	ΔCt (Ct_2-Ct_1)	Result	
Yellow (C677T)	Ct_1	Ct_2	$2 < \Delta Ct$	CC	هموزیگوت سالم
			$\Delta Ct < -2$	TT	هموزیگوت جهش‌یافته
			$-2 < \Delta Ct < +2$	CT	هتروزیگوت سالم
Green (A1298C)	Ct_1	Ct_2	$2 < \Delta Ct$	AA	هموزیگوت سالم
			$\Delta Ct < -2$	CC	هموزیگوت جهش‌یافته
			$-2 < \Delta Ct < +2$	AC	هتروزیگوت سالم

حساسیت و اختصاصیت آنالیتیکال

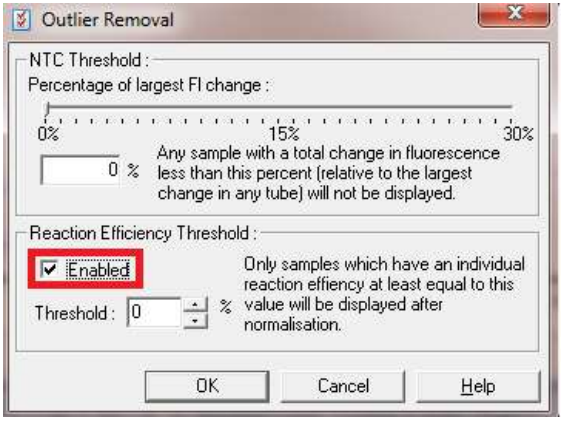
کیت SENMURV MTHFR امکان تشخیص جهش‌های C677T و A1298C را با LOD برابر با ۱ نانوگرم در میکرولیتر و با اختصاصیت ۱۰۰٪ ممکن می‌سازد.

نکات آنالیز نتایج در دستگاه‌های مختلف:

دستگاه : Rotor-Gene

آنالیز اطلاعات در دستگاه Rotor-gene ۶۰۰۰ و Rotor-gene ۳۰۰۰ باید توسط نرم‌افزار دستگاه و بر اساس دستورالعمل دستگاه صورت گیرد.

۱. از منوی Quantitation، Analysis را انتخاب کرده و روی یکرنگ، به طور مثال Green، دوبار کلیک کنید.
۲. با کلیک بر گزینه ی Outlier Removal، Reaction Efficiency Threshold را فعال کنید (شکل ٦).



شکل ٦. تنظیمات دستگاه

نشانه ها

	Research Use Only	برای مصارف پژوهشی
	Catalog Number	کد کالا
	Batch Number	شماره بچ تولید شده
	Temprature Limitation	محدودیت دمایی
	Concult Instructon For Use	مطالعه دستورالعمل
	Content sufficent for <n> tets	تعداد تست
	Use by	تاریخ انقضا
	Manufacturer	آدرس

اطلاعات تماس

شرکت فناوری بن یاخته- گروه سین مورو

دفتر مرکزی : تهران، سعادت آباد، میدان فرهنگ، بلوار 24 متری سعادت آباد، خیابان حیدرنیا(دوم شرقی)، پلاک9 ، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی : 1997775555 پشتیبان فنی: 09301821601

تلفن تماس: 02122082120

Web Site: www.Senmurv.co Email: info@senmurv.ir