

**کیت تشخیص جهش MTHFR C677T**  
(کیت کیفی PCR تکثیر اختصاصی ال)

Ref: APMTHC6K1  
(For Investigation Use Only, IUO)

**مقدمه:**

MTHFR مخفف نام ژنی است که آنزیمی بنام Methylene tetrahydrofolate reductase را کدگذاری می کند. آنزیم MTHFR به بدن در تولید پروتئین کمک می کند. جهش در ژن MTHFR با بیماری های ترومبوآمبولیک و قلبی عروقی همراه است، که می تواند منجر به لخته شدن خون، سکتة مغزی، آمبولی و حملات قلبی شود. دو جهش از MTHFR شایع ترین نوع آن بوده و تقریباً ۴۰-۳۰٪ از جمعیت دارای جهش در موقعیت C677T و ۲۰٪ از جمعیت دارای جهش در موقعیت A1298C می باشد. افراد مبتلا به این جهش ها در معرض خطر ابتلا به بیماری ترومبوآمبولی و قلبی عروقی قرار دارند. این کیت برای تشخیص کیفی جهش MTHFR C677T به عنوان کیت IUO ساخته شده است.

**جزئیات کیت:**

ردیف	محتویات	حجم	شرایط نگهداری
۱	ویال مستر میکس آماده استفاده	۴۵۰ μl	≤ -۲۰°C
۲	ویال آنزیم آماده استفاده	۷ μl	≤ -۲۰°C
۳	ویال یافر آماده استفاده	۵۰۰ μl	≤ -۲۰°C
۴	کنترل مثبت متیون متاسیون MTHFR C677T هتروزیگوس	۱۵ μl	≤ -۲۰°C
۵	کنترل منفی	۱۵ μl	≤ -۲۰°C

**نمونه مناسب:**

- نمونه خون همراه با ضد انعقاد EDTA  
- باقی کت

**مواد و وسایل مورد نیاز:**

- دستگاه Thermal cycler PCR machines با مشخصات: Model: Veriti/ Sense Quest/ Simpli AMP (LIFE)/ Peqstar2x/ Proflex PCRsystem/ techn TC412/ PeQ lab
- هود ایمنی زیستی کلاس II
- سمپلر در حجم های ( 0.5-10 μl , 10-100 μl , 100-1000 μl )
- تجهیزات نظیر (ورنکس، Minispin، میز کار PCR یا هودهای ایمنی زیستی)
- ظروف پلاستیکی: میکروتیوب با حجم ۰/۱ یا ۰/۲ میلی لیتر
- مواد مصرفی: دستکش یکبار مصرف فاقد پودر، روبوش های آزمایشگاهی، سرسمپلرهای دارای فیلتر آئروسول در حجم های ۱۰۰۰ μl ، ۱۰۰ μl ، ۱۰ μl
- خودکار علامت گذاری آزمایشگاهی و رول دستمال کاغذی
- یخچال
- فریزر (۲۰°C-)

**شرایط نگهداری و انتقال کیت:**

محتویات کیت را در دمای (۲۰°C-) تا تاریخ انقضا درج شده (۱۲ ماه) بر روی بسته بندی کیت نگهداری و حمل کنید.

**دستورالعمل PCR:**

PCR مطابق روش زیر انجام می شود.

تمام میکروتیوب ها را بر روی رک سرد قرار دهید.

۱. ۱/۵ میکرولیتر مستر میکس را به تمامی میکروتیوب های نام گذاری شده اضافه کنید.

۲. ۱/۵ میکرولیتر از کنترل منفی، نمونه DNA بیمار و کنترل مثبت را به ترتیب به میکروتیوب های نام گذاری شده اضافه کنید.

۳. یک میکروتیوب را نیز به عنوان NTC کنار بگذارید.

۴. میکروتیوب ها را در ترمال سایکلر کالیبر شده قرار دهید و برنامه PCR را مانند زیر اجرا کنید.

**مشخصات واکنش حرارتی:**

چرخه	زمان	دما	فعال سازی اولیه
۱	۱۰ دقیقه	۹۵°C	amplification
۴۰	۳۰ ثانیه	۹۵°C	
	۳۰ ثانیه	۶۰°C	
۱	۳۰ ثانیه	۷۲°C	Final Extension
	۵ دقیقه	۷۲°C	

۵. پس از پایان کار دستگاه، میکروتیوب های دیگری را مرتب و نام گذاری کنید، سپس به هر میکروتیوب ۰/۲ میکرولیتر آنزیم و ۲۰ میکرولیتر یافر اضافه کنید سپس ۱۰ میکرولیتر محصول به میکروتیوب های نام گذاری شده اضافه کنید و دقت کنید که منجر به آلودگی نشود.

۶. میکرو تیوب ها را به مدت ۱۶±۲ ساعت (Over night) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید.

۷. پس از اتمام واکنش PCR، محصولات آن جهت الکتروفورز توسط ژل آگارز ۴٪ به مدت ۲۰-۵۰ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰ میلی آمپر و یا با PAGE به مدت ۵۰ دقیقه با ولتاژ ۱۵۰ میلی آمپر مورد استفاده قرار گیرند.

**نکته:**

- برای دستیابی به نتایج دقیق و قابل اعتماد، توصیه می شود برای هر بیمار آزمایش PCR به صورت duplicate (دو میکروتیوب برای هر بیمار) انجام شود.
- ویال های کنترل مثبت و منفی را قبل از مصرف به منظور همگن سازی محتویات داخل آنها به مدت کوتاهی تکان داده و مخلوط (Vortex) نمایید.
- به خاطر داشته باشید که از کنترل مثبت با نهایت دقت استفاده شود عملکرد نادرست می تواند منجر به نتایج مثبت کاذب شود. شرکت تولید کننده کیت هیچ مسئولیتی در قبال چنین مواردی نخواهد داشت. برای به حداقل رساندن آلودگی از سر سمپلرهای استریل دارای فیلتر استفاده نمایید.

021-26422362

Co.ap-rad.com

order@co.ap-rad.com

شرکت پژوهش و توسعه امیر بیوند

ایران، تهران، خیابان شریعی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، واحد ۱ / کد پستی: ۱۹۱۹۷۴۹۴۱

### نتایج و تفسیر:

باند‌های زیر روی ژل الکتروفورز قابل مشاهده خواهند بود

- هیچ باندی در NTC وجود ندارد، مشاهده ی هر باندی در NTC به علت آلودگی بوده و تست باید تکرار شود.
- باند‌های بیمار به شرح زیر خواهد بود:

Undigested		۱۹۸ bp
Digested	نرمال	۱۹۸ bp
	هتروزیگوت	۱۹۸ / ۱۷۵ / ۲۳ bp
	هموزیگوت	۱۷۵ / ۲۳ bp

### اختصاصیت آنالیتیکال:

Prothrombin ۵ از ۵ نمونه نرمال، ۵ نمونه بیمار با ۵.F.V.L. ۵ نمونه بیمار با PAI 844 و PAI 4G / 5G و ۵ بیمار با G20210A. ۵ نمونه بیمار با MTHFRA1298T مورد آزمایش قرار گرفت و هیچ واکنش مثبت کاذبی مشاهده نشد

### مطالعات بالینی:

برای ارزیابی بالینی حساسیت و اختصاصیت، ۱۰ نمونه جهش یافته مثبت شناخته شده و تایید شده و ۲۰ نمونه DNA نرمال توسط کیت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به شرح زیر نشان داده شد.

	روش مرجع		
	مثبت	منفی	
MTHFR C677T Mutation detection	مثبت	10	0
	منفی	0	20

### کنترل کیفیت:

قبل از انجام هضم آنزیمی، درمحصول PCR تمام نمونه ها باید باند ۱۹۸ جفت باز مشاهده شود.

### دفع ضایعات:

- برای دفع ضایعات به قوانین مصوب وزارت بهداشت توجه کنید.
- در صورتی که ضایعات منشا انسانی یا حیوانی داشته باشند به عنوان مواد خطرناک زیستی شناخته شده و باید با احتیاط دفع گردند. در هنگام استفاده و یا دفع نمونه ها از اقدامات احتیاطی عمومی استفاده کنید.

### منابع:

Rouhi-Broujeni H, Pourghesari B, Hashemini AM. Association of Homozygous Thrombophilia Polymorphisms and Venous Thromboembolism in Shahrekord, Iran. *Tanaffos*. 2016;15(4):218-224. PMID: 28469678; PMCID: PMC5410118

علام و توضیحات	
	سری ساخت
	شماره رفرنس
	تاریخ تولید
	تاریخ انقضا
	مطالعه بروشور
	استفاده در موارد تشخیصی و بالینی
	استفاده در موارد تحقیقاتی
	شرایط نگهداری
	آدرس شرکت
علام خطر	
	

جهت ارتباط با واحد پشتیبانی با شماره ۰۲۱-۲۶۴۲۲۹۴۰ تماس بگیرید.

021-26422362

Co.ap-rad.com

order@co.ap-rad.com

شرکت پژوهش و توسعه امیر پیوند

ایران، تهران، خیابان شریعی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهارن، پلاک ۱۴۸، واحد ۱ / کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۱