

کیت تشخیص جهش MTHFR A1298C

Ref: APMTHA1K1

(For Investigation Use Only, IUO)

مقدمه:

MTHFR مخفف نام زنی است که آنزیمی بنام Methylenetetrahydrofolate reductase را کدگذاری می کند. آنزیم MTHFR در بدن به تولید پروتئین کمک می کند. جهش در ژن MTHFR با بیماری های ترومبومبولیک و قلبی عروقی همراه است که می تواند منجر به لخته شدن خون، سکنه مغزی، آمبولی و حملات قلبی شود. ایجاد دو جهش در ژن 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 باشند. افراد مبتلا به این جهش ها در معرض خطر ابتلا به بیماری ترومبومبولی و قلبی عروقی قرار دارند.

این کیت برای شناسایی کیفی جهش MTHFR A1298C به عنوان کیت IUO ساخته شده است.

جزئیات کیت:

ردیف	محتویات	حجم	شرایط نگهداری
۱	ویال مسترمیکس آماده استفاده	۴۵۰ μl	≤ -۲۰°C
۲	ویال آنزیم آماده استفاده	۷ μl	≤ -۲۰°C
۳	ویال بافر آماده استفاده	۵۰۰ μl	≤ -۲۰°C
۴	کنترل مثبت موتاسیون هتروزایگوس MTHFR A1298C	۱۵ μl	≤ -۲۰°C
۵	کنترل منفی	۱۵ μl	≤ -۲۰°C

نمونه مناسب:

- نمونه خون همراه با ضد انعقاد EDTA
- بافی کت

مواد و وسایل مورد نیاز:

- دستگاه Thermal cycler PCR machines با مشخصات: Model: Veriti/ Sense
- دستگاه PCR system/ technه Quest/ Simpli AMP (LIFE)/ Peqstar2x/ Proflex TC412/ PeQ lab
- هود ایمنی زیستی کلاس II
- سمپلر در حجم های (0.5-10 μl, 10-100 μl, 100-1000 μl)
- تجهیزات نظیر (ورتنس، 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، روپوش های آزمایشگاهی، سرسمپلرهای دارای فیلتر آتروسل 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.

- ۱/۵ میکرولیتر مسترمیکس را به تمامی میکروتیوب های نام گذاری شده اضافه کنید.
- 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.

بروفایل واکنش حرارتی:

چرخه	زمان	دما	فعال سازی اولیه
۱	۵ دقیقه	۹۵ °C	amplification
۳۵	۱ دقیقه	۹۴ °C	
	۱ دقیقه	۶۰ °C	
	۳۰ ثانیه	۷۲ °C	
۱	۷ دقیقه	۷۲ °C	Final Extension

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 بافر 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.

نتایج و تفسیر:

باند‌های زیر روی ژل الکتروفورز قابل مشاهده خواهند بود

۱. هیچ باندهی در NTC وجود ندارد، مشاهده‌ی هر باندهی در NTC به علت آلودگی

بوده و تست باید تکرار شود.

۲. باندهای بیمار به شرح زیر خواهد بود:

Undigested		۱۴۵bp
Digested	نرمال	۷۹/۳۷ / ۲۹ bp
	هتروزایگوت	۱۰۸/۷۹/۳۷ / ۲۹ bp
	هوموزایگوت	۱۰۸ / ۳۷bp

اختصاصیت آنالیتیکال:

بیش از ۵ نمونه نرمال، ۵ نمونه بیمار با F.V.I.L، ۵ نمونه بیمار با Prothrombin G20210A، ۵ نمونه بیمار با PAI 4G / 5G، PAI 844 و ۵ نمونه بیمار با MTHFR C677T 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 A1298C mutation detection	مثبت	10	0
	منفی	0	20

کنترل کیفیت:

قبل از انجام هضم آنزیمی، درمحل PCR تمام نمونه‌ها باید باند ۱۴۵ جفت باز مشاهده شود.

دفع ضایعات:

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

منابع:

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

علامت 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
علامت 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 امیرپوند

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