

راهنمای کیت

MTHFR-677 RG

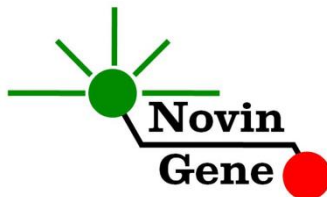
جهت تشخیص جهش (C677T) MTHFR
به روش Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene 6000/Q
مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-20-101

ویرایش ۱/۲

دی ۱۳۹۸



فهرست مندرجات:

۱. مقدمه..... ۲
۲. محتویات کیت..... ۳
۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت..... ۳
۴. سایر موارد مورد نیاز..... ۳
۵. نکات قابل توجه..... ۴
۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن..... ۵
۷. عوامل مزاحم..... ۵
۸. استخراج DNA..... ۶
۹. کنترل داخلی..... ۶
۱۰. دستور کار PCR..... ۶
۱۱. تنظیم دستگاه RotorGene 6000/Q..... ۷
۱۲. آنالیز نتایج..... ۸

کیت **MTHFR 677 RG** جهت استفاده با دستگاه RotorGene و به منظور تشخیص جهش MTHFR C677T در DNA استخراج شده از سلول های انسانی می باشد. این کیت مخصوص استفاده تحقیقاتی است.

۱. مقدمه

MTHFR نام اختصاری آنزیم متیلن ترا هیدروفولات ردوکتاز (Methylenetetrahydrofolate reductase) می باشد که در تنظیم متابولیسم فولات (folate) و هموسیستئین (homocysteine) نقش دارد. جایگزینی C677T در ژن این آنزیم، فعالیت آن را به میزان ۳۰ تا ۶۵٪ کاهش میدهد. جایگزینی A1298C نیز باعث کاهشی حدود ۱۵ تا ۳۰٪ در فعالیت این آنزیم می شود. لذا این جایگزینی ها از مهم ترین عوامل ژنتیکی موثر بر میزان هموسیستئین خون و متابولیسم آن محسوب می شوند و در نتیجه با طیف وسیعی از بیماری ها مرتبط می گردند. از جمله می توان ترومبوز شریانی، تصلب شرایین، بیماری قلبی ناشی از عروق کرونر، نقص لوله عصبی (در دوران جنینی)، انواعی از سرطان، اثرات جانبی برخی داروها و پوکی استخوان را نام برد. البته باید توجه داشت که در موارد فوق اتفاق نظر وجود ندارد و گاهی یافته ها متناقض می باشند. شیوع این جایگزینی در جوامع مختلف متفاوت است و بین ۴٪ تا ۵۰٪ متغیر می باشد.

کیت **MTHFR 677** برای تشخیص جایگزینی C677T در ژن MTHFR به روش Real-Time PCR و با استفاده از دستگاه RotorGene طراحی و تولید شده است. در این روش همزمان با انجام PCR، محصول آن با استفاده از پروب های فلورسانس شناسایی می شود. بررسی میزان تغییرات تابش فلورسانس امکان شناسایی توالی هدف را بدون نیاز به مراحل بعدی مانند

الکتروفورز فراهم می کند که به نوبه خود امکان آلودگی محیط کار با محصول PCR را تا حد زیادی کاهش می دهد.

۲. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک لوح فشرده و مواد زیر می باشد:

برچسب	محتوا	حجم
MTHFR Mix	میکس آماده برای PCR *	۴۸۰ میکرولیتر
MM Pos Ctrl	شاهد مثبت هموزیگوت	۵۰ میکرولیتر
MW Pos Ctrl	شاهد مثبت هتروزیگوت	۵۰ میکرولیتر
WW Neg Ctrl	شاهد منفی	۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

* یک، دو یا چهار تیوب، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت

تمامی مواد کیت که در جدول بالا ذکر شده است باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند.

از ذوب و انجماد این مواد بیش از سه بار که باعث کاهش حساسیت کیت می شود خودداری کنید.

۴. سایر موارد مورد نیاز

برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:

- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
- سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب
- ورتکس (Vortex Mixer)
- بلوک حرارتی رومیزی (Dry Block Heater)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA
- تیوب ۱/۷ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

۵. نکات قابل توجه

برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:

- هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج، فضای آماده سازی مواد (برای افزودن میکس به لوله های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به لوله PCR) می باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود، به ویژه سمپلر را داشته باشند. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.

- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با دستمال آغشته به الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.
- پیش از استفاده محتویات کیت را روی یخ خرد شده قرار دهید تا کاملاً ذوب شده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن مواد هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. استفاده از یخ های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده مناسب نمی باشد.
- در حین کار، میکروتیوب های PCR را روی بلوک سرد گذاشته، و از گذاشتن آنها بر یخ خرد شده خودداری کنید.

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش MTHFR C677T با این کیت، خون محیطی (peripheral blood) می باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می تواند EDTA یا سیترات باشد. خون کامل را می توان تا ۷۲ ساعت در ۴ درجه نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود. برای نگهداری نمونه در زمان های طولانی تر از چند روز بهتر است آن را به حجم های کوچک تقسیم نموده و سپس در دمای ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری نمود. در چنین شرایطی نمونه تا چند ماه پایدار می ماند.

DNA را می توان مستقیماً از خون کامل یا از بافی (buffy coat) استخراج کرد.

۷. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می شود. به همین دلیل، لوله حاوی هپارین به عنوان ضد انعقاد مناسب نیست و نباید استفاده شود. همچنین نمونه بیماران تحت درمان با هپارین نیز برای PCR مناسب نمی باشد.

مقادیر بالای بلیروبین (تا حداکثر ۴/۵ میلی گرم در دسی لیتر) و چربی (تا حداکثر ۱۰۰۰ میلی گرم در دسی لیتر) و نیز همولیز خون برای این آزمایش مزاحمتی ایجاد نمی کند.

۸. استخراج DNA

برای استخراج DNA از روشها و کیت‌های مختلفی می توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت‌های زیر را توصیه می کنیم:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat# 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

۹. کنترل داخلی

این کیت نیازی به استفاده از کنترل داخلی ندارد زیرا هر فرد حامل ژن طبیعی یا جهش یافته MTHFR می باشد و در صورت هتروزیگوت بودن نیز حامل هر دوی آنها خواهد بود. بنابراین همیشه باید نتیجه این آزمایش حداقل برای یکی از انواع طبیعی یا جهش یافته ژن مثبت باشد. در صورتی که فردی برای هر دو نوع طبیعی و جهش یافته منفی باشد، باید آزمایش را تکرار کرد.

۱۰. دستور کار PCR

ابتدا تمامی لوله های کیت را روی یخ خرد شده قرار دهید تا بطور کامل محتویات آن ها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آنها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفوژ کنید. تعداد مورد نیاز لوله PCR را روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، یک لوله برای شاهد مثبت هموزیگوت، یک لوله برای شاهد مثبت هتروزیگوت، یک لوله برای شاهد منفی و یک لوله نیز برای کنترل بدون DNA در نظر بگیرید.

به هر لوله ۲۰ میکرولیتر از **MTHFR Mix** اضافه کنید. سپس ۵ میکرولیتر از **DNA** استخراج شده و یا **شاهد** یا آب به هر لوله اضافه کنید و درپوش لوله ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید. توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۱. تنظیم دستگاه RotorGene

- ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!
 - توجه داشته باشید که در صورتی که دمای هوای آزمایشگاه حدود ۳۰ درجه یا بالاتر باشد، تنظیم دما توسط دستگاه روتورژن دچار اختلال شده و آزمایش ناموفق خواهد بود. دمای مناسب برای این دستگاه بین ۲۰ الی ۲۵ درجه می باشد!
- دستگاه را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر متصل کرده و آن را به برق وصل کنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

در لوح فشرده همراه کیت روی فایل MTHFR 677 RG 0.2 یا MTHFR 0.1 677 RG (با توجه به لوله های استفاده شده) دوبار کلیک کنید تا برنامه باز شود. در منوی بالای صفحه، دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) را کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و پس از انتخاب محل مورد نظر در کامپیوتر، دکمه Save را بزنید تا دستگاه روشن شود. در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. همچنین در صورت تمایل می توانید دستگاه را مطابق جدول زیر تنظیم نمایید:

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 3 min	1
2	95°C x 15 sec	40
	55°C x 40 sec*	
	72°C x 20 sec	
3	95°C x 15 sec	1
4	40°C x 10 min	1
5	45°C x 1 min	1
6	Melt 50°C-80°C *	1

تابش فلورسانس باید در مرحله ای که با ستاره مشخص شده اند و برای رنگ FAM ثبت شود.

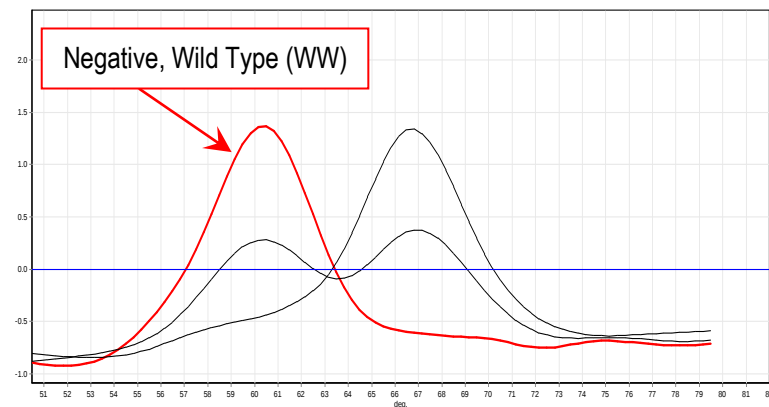
۱۲. آنالیز نتایج

برای آنالیز نتایج به راهنمای RotorGene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Melt Analysis را انتخاب کرده و روی Melt A Green دوبار کلیک کنید.

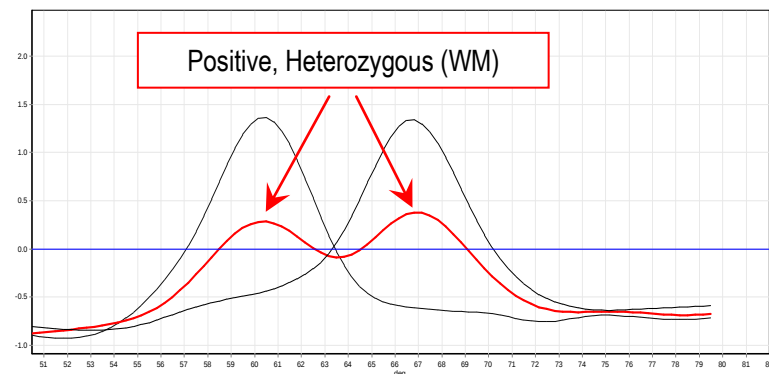
در منوی سمت راست صفحه روی “Flip sign of dF/dT” کلیک کنید تا غیر فعال شود (علامت ☒ آن حذف شود). در پایین پنجره “Melt Curve Analysis” روی دکمه “Auto-Scale” کلیک کنید. سپس آستانه (threshold) را بالاتر از فلورسانس زمینه قرار دهید به گونه ای که فقط دو قله (پیک) در بالای آن باقی بماند. **قله سمت چپ (۶۰ تا ۶۱ درجه)** نماینده **آلل طبیعی (W)** و **قله سمت راست (۶۶ تا ۶۷ درجه)** نماینده **آلی جهش یافته (M) یعنی C677T می باشد.** نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه فقط دارای یک قله در دمای ۶۰ تا ۶۱ درجه باشد از نظر MTHFR C677T **منفی** است و **هموزیگوت سالم (WW)** محسوب می شود.
- در صورتی که نمونه فقط دارای یک قله در دمای ۶۶ تا ۶۷ درجه باشد از نظر MTHFR C677T **مثبت** است و **هموزیگوت (MM)** محسوب می شود.
- در صورتی که نمونه دارای یک قله در دمای ۶۰ تا ۶۱ درجه و یک قله در دمای ۶۶ تا ۶۷ درجه باشد از نظر MTHFR C677T **مثبت** است و **هتروزیگوت (MW)** محسوب می شود.
- در شرایط زیر آزمایش غیر معتبر بوده و باید تکرار شود:
- در صورتی که یک نمونه هیچ قله ای در دمای ۶۰ تا ۶۱ یا ۶۶ تا ۶۷ درجه نداشته باشد.
- در صورتی که برای نمونه بدون DNA یا NTC یک قله (در هر دمایی) مشاهده شود.

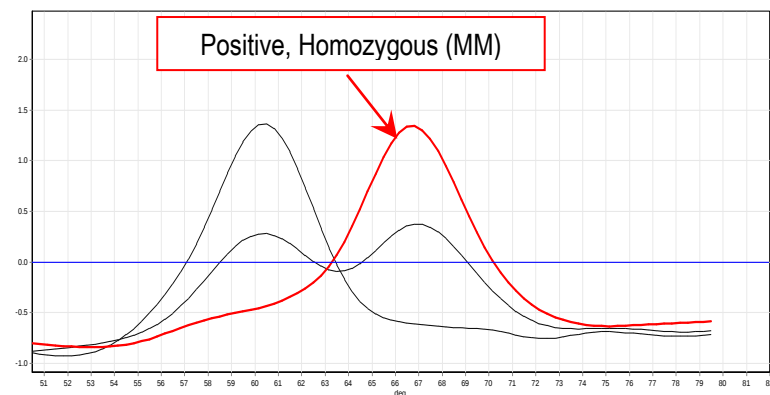
- برای تعیین ژنوتایپ هر نمونه همچنین می توان در صفحه آنالیز، در منوی سمت راست هر قله را با عنوان W و M تعریف نمود. برای توضیحات بیشتر در این زمینه به راهنمای RotorGene مراجعه نمایید. برای مشاهده گراف مورد انتظار برای نمونه های منفی، مثبت هتروزیگوت و مثبت هموزیگوت، تصاویر یک، دو و سه را ملاحظه فرمایید.



تصویر ۱: منحنی مربوط به نمونه ی منفی یا WW



تصویر ۲: منحنی مربوط به نمونه ی مثبت هتروزیگوت یا WM



تصویر ۳: منحنی مربوط به نمونه ی مثبت هموزیگوت یا MM

MTHFR-677 RG

Kit Manual

**For Real-Time PCR Detection of MTHFR
(C677T) Variant**

For use with Rotor-Gene 6000/Q
Research use only

NG-WI-ASL-20-101
Version 1.2
December 2019

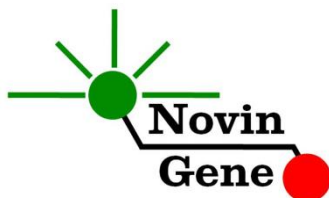


Table of Contents:

1. Introduction	2
2. Kit Contents	3
3. Storage and Stability	3
4. Additionally Required Materials	3
5. General Precautions	4
6. Specimen, Storage and Transport	5
7. Interfering Substances	5
8. DNA Isolation	5
9. Internal Control (IC)	6
10. PCR Protocol	6
11. Programming of RotorGene6000/Q	7
12. Data Analysis	7

MTHFR-677 RG kit is intended for the detection of MTHFR (C677T) variant in genomic DNA extracted from human cells with RotorGene machine. This kit is intended for research use only

1. Introduction

MTHFR stands for Methylenetetrahydrofolate reductase which is a key regulatory enzyme in folate and homocysteine metabolism. Since, the C677T and A1298C variants show reduced activity (30-65% and 15-30% respectively), these polymorphisms are among the the most important genetic determinants of plasma total homocysteine. Due to their influence on homocysteine metabolism, they have been linked to several complex disorders including arterial thrombosis, atherosclerosis, coronary heart disease, neural tube defects, several types of cancer, adverse drug interactions and osteoporosis though, findings are still controversial. Depending on the ethnic background up to 50% of population may carry the variant allele of MTHFR.

MTHFR-677 RG kit provides a ready-to-use Real-Time PCR system for detection of C677T variant with RotorGene machine.

This method applies fluorescent probes allowing detection of amplified product. Analysis of fluorescent kinetics also leads to assessment of the target sequence in the reaction without requiring post-amplification analysis, reducing the possibility of contamination with the PCR product.

2. Kit Contents

The kit contains a manual, a CD with Rotor-Gene™ template and following reagents:

Label	Content	Quantity
MTHFR Mix	PCR Master mix*	480µl
MM Pos Ctrl	MM Positive Control	50µl
MW Pos Ctrl	MW Positive Control	50µl
WW Neg Ctrl	WW Negative Control	50µl
Water	PCR Grade Water	200µl

* 1, 2 or 4 tubes for 24, 48, or 96 reaction kits, respectively.

3. Storage and Stability

All the kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiry date mentioned. Avoid repeated freeze-thaws more than 3 times to prevent reduced sensitivity.

4. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Table top microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease free 1.7ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

5. General Precautions

In order to prevent false results, always pay attention to the following points:

- **Treat all samples as potentially infectious.**
- Within the pre-PCR work area assign three separate spaces for a) Sample storage and extraction; b) Reagent preparation where the Master Mix is aliquoted into tubes; and c) Reaction preparation area for addition of extracted samples to the tubes.
- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.

- Thaw kit components on **crushed ice** completely, mix by flickering followed by a quick spin and **store on crushed ice** after.
- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cold blocks instead.

6. Specimen, Storage and Transport

Peripheral blood should be collected in sterile condition in proper and sterile tubes. We recommend EDTA or citrate as anticoagulant for MTHFR C677T variant detection. Whole blood should be shipped and stored at +4°C (stable for 3 days). Whole blood or buffy coat can be stored at +4°C for a few days. Otherwise should be aliquoted and stored at -20°C which is stable for few months.

DNA can directly be extracted from whole blood or buffy coat.

7. Interfering Substances

Heparin (more than 10 IU/ml) affects the PCR. Blood collected in heparin containing tubes should not be used. Samples of heparinized patients must not be used as well. Elevated levels

of bilirubin (≤ 4.5 mg/dl) and lipids (≤ 1000 mg/dl) and hemolytic samples do not influence the extraction and PCR.

8. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend using either High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat. no. 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany) or QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

9. Internal Control (IC)

This kit requires no internal control since all the patients carry either wild type or mutant copy of the *MTHFR* gene. Therefore, it must be positive for at least wild type or the mutant copy of the gene. If a patient is negative for both above, then the test should be repeated.

10. PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely followed by brief mixing and a quick spin. Place required number of tubes on cold block.

MTHFR-677 RG (V1.1)

Consider one tube for each sample plus one for each control and one for no-template-control (NTC).

Pipette 20ul of MTHFR Mix directly to each tube followed by adding 5ul of standard or isolated DNA.

Cap the tubes and visually inspect to make sure all are capped securely. Place tubes in the machine.

Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring too.

11. Programming of RotorGene 6000/Q

- Before you start the machine make sure you have attached the ring on the rotor!

- Please note that at temperatures of 30°C and above, RotorGene cooling system fails and test results are not valid! The optimum temperature for proper function of this machine is 20-25°C!

Open the CD provided in the kit and double click on MTHFR 677 RG 0.2 or on MTHFR 677 Strip (according to the used tubes) to open the program. Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop up window click start again and save program. On the pop up sample window, name the samples according to the list.

You may also set Rotor-Gene according to the following table:

Step	Temperature and time	Cycles
------	----------------------	--------

1	95°C x 3 min	1
2	95°C x 15 sec	40
	55°C x 40 sec*	
	72°C x 20 sec	
3	95°C x 15 sec	1
4	40°C x 10 min	1
5	45°C x 1 min	1
6	Melt 50°C-80°C *	1

Fluorescence should be collected at steps marked with star (*) for FAM.

The PCR Mix is ROX free.

12. Data Analysis

Analyze the data according to manufacturer recommendations. Briefly, on analysis menu click on Melt tab and then, double click on “Melt A Green”.

On the right side menu, uncheck the box for “Flip sign of dF/dT”. On the bottom of “Melt Curve Analysis” window click on “Auto-Scale” tab. Set threshold manually above the background, so only two picks remain above the threshold. **The left pick (at 60-61°C) is for wild type allele (W) and the right one (at 66-67°C) is for the mutant allele (M).** Analyze the results as follows:

- A sample with only a single pick at 60-61°C is Negative for C677T variant and is considered **Negative or wild type homozygous (WW)**.
- A sample with only a single pick at 66-67°C is **Positive and homozygous (MM) for C677T** variant (both alleles are C677T variant).
- A sample with two picks at 60-61°C and at 66-67°C is **Positive for C677T variant and heterozygous (WM)**. Such a patient carries both wild type and variant alleles for MTHFR.

Results are inconclusive and the test should be repeated if:

- No pick is detected for a patient at either 60-61 or 66-67°C.
- A pick is detected for NTC.

Genotypes can be called automatically if bins are defined for W and M picks. Please refer to the RotorGene 6000/Q manual for further information.

Figures 1, 2 and 3 represent sample analysis and the relevant peak for each genotype.

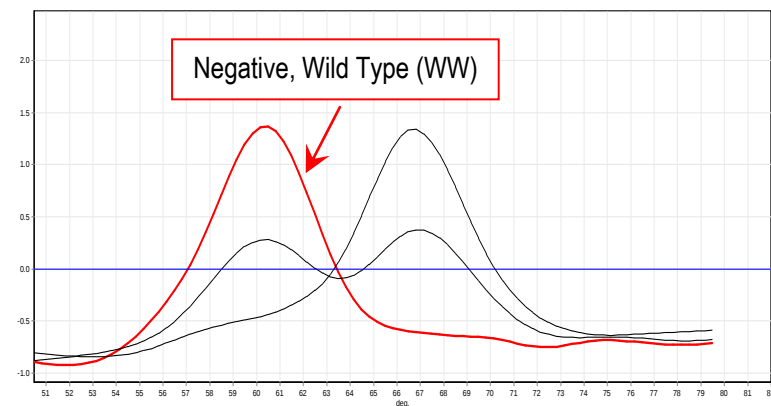


Figure 1: Wild type (WW) graph on RotorGene

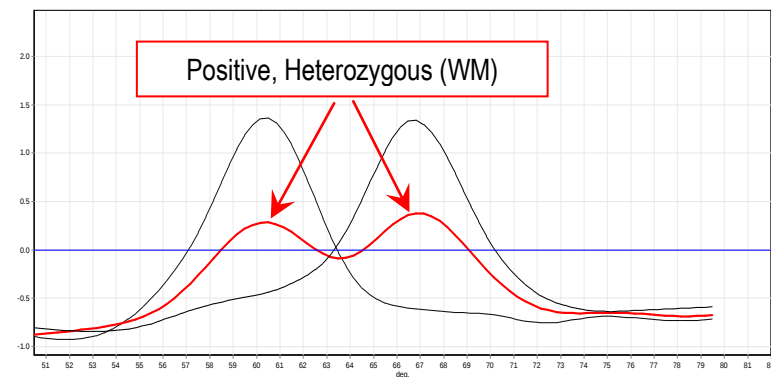


Figure 2: Mutant Heterozygote (WM) graph on RotorGene

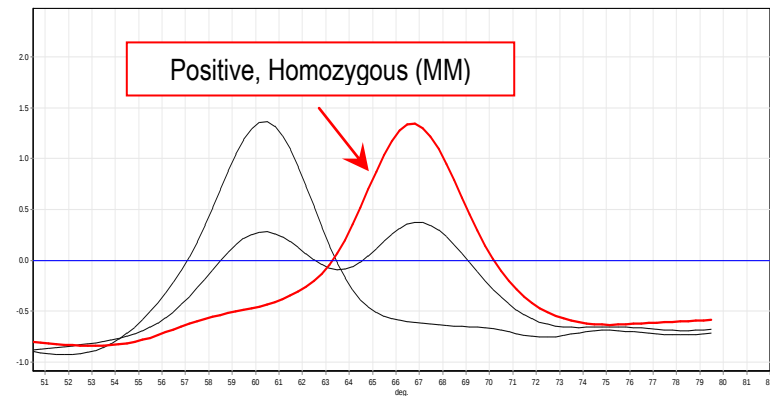


Figure 3: Mutant Homozygote (MM) graph on RotorGene

