Delta hSNiP (C677T) PCR Kit

A Real-Time PCR Assay for C677T Mutation Detection in *MTHFR* Gene

REF DD010-001-24 RUO

دستورالعمل

کیت تشخیص جهش C677T در ژن *MTHFR* بر اساس Real-time PCR

DELTA BIOTECHNOLOGY
دلسا تشخیص آریا (دلتا)

۱) مقدمه

افزایش مقادیر هموسیستئین در خون (Hyperhomocysteinemia) ریسک فاکتور بیماری‌های قلبی-عروقی (۱)، ترومبوز سیاهرگی (۲) و میگرن (۳) می‌باشد. یکی از دلایل افزایش هموسیستئین، متابولیسم ناقص بدلیل نقص‌های ژنتیکی در ژن *MTHFR* است. ژن *MTHFR* آنزیم متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز را کد می‌کند که در تبدیل هموسیستئین به متیونین نقش موثری دارد و بعنوان تنظیم کننده‌ی اصلی مسیر متابولیسم فولیک اسید می‌باشد. جهش C677T (Ala 222 Val) در ژن *MTHFR* فعالیت این آنزیم را کاهش داده و منجر به افزایش تجمع هموسیستئین در خون می‌شود (۴و۵). بر اساس اطلاعات موجود در وبسایت https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1801133 فراوانی الل جهش‌یافته در بین جمعیت‌های مختلف جهان حدود ۰/۳۴ گزارش شده است. درحالیکه، فراوانی الل جهش یافته در جمعیت ایرانی حدود ۰/۲۳ گزارش شده است (http://www.iranome.ir/variant/1-11856378-G-A). همچنین، در پروژه‌ی ایرانوم (Iranome) فراوانی افراد هتروزیگوت و هموزیگوت دارای جهش در کشور به ترتیب ۰/۳۵ و ۰/۰۵ گزارش شده است.

۲) کاربرد کیت

"Delta hSNiP (C677T) PCR Kit" یک کیت تشخیص مولکولی بر پایه تکنیک Probe-based real-time PCR است که با استفاده از آن می‌توان به بررسی کیفی وجود یا عدم جهش C677T در ژن *MTHFR* پرداخت. بنابراین با استفاده از کیت حاضر می‌توان ژنوتایپ‌های هموزیگوت برای الل وحشی (C/C)، هتروزیگوت (C/T) و هموزیگوت برای الل جهش‌یافته (T/T) را شناسایی نمود. با استفاده از این کیت DNA استخراج شده از نمونه‌های بالینی افراد مثل خون مورد آزمایش قرار می‌گیرند. لذا قبل از انجام PCR باید نمونه‌های DNA از نمونه‌های بالینی با استفاده از کیت‌های معتبر موجود در بازار استخراج شود.

۳) اساس تست

اساس کار کیت حاضر بر پایه‌ی تکنیک تفکیک اللی (Allelic discrimination) است. به‌منظور بررسی ناحیه‌ی جهش‌یافته مورد نظر (بعنوان مثال C677T) از ۲ پروب اختصاصی با ۲ رنگ فلوروسنت (فلوروفور) متفاوت در انتهای ´۵ استفاده می‌شود که هر کدام از آن‌ها می‌توانند بطور مجزا یک الل (یک الل وحشی و یک آلل جهش یافته) را تشخیص دهند. در انتهای ´۳ هر دو پروب مولکول خاموش‌کننده (کوئنچر) وجود دارد که از ساطع شدن نور فلوروسنت جلوگیری می‌کند. در حین انجام PCR در صورت وجود الل جهش یافته، پروب اختصاصی آن (FAM) و در صورت وجود الل طبیعی، پروب اختصاصی مربوط به آن (HEX) متصل می‌شوند و پس از اتصال هریک از پروب‌ها، در اثر فعالیت اگزونوکلئازی آنزیم پلیمراز هیدرولیز می‌شوند. بدنبال هیدرولیز پروب، کوئنچر از فلوروفور جدا شده و در نتیجه رنگ‌های فلوروسنت مختلف آزاد می‌شوند که دستگاه Real-time PCR قادر به خوانش و ثبت آن می‌باشد. چنانچه الل جهش یافته (مثلا C677T) وجود داشته باشد پروب اختصاصی آن متصل شده و سپس هیدرولیز شده و رنگ خاص خود (بعنوان مثال رنگ سبز یا FAM) آزاد می‌شود. در صورت وجود الل وحشی (C677)، پروب اختصاصی آن متصل و هیدرولیز می‌شود و در نتیجه رنگ فلوروسنت دیگر (مثلا رنگ زرد یا HEX) آزاد می‌شود. در نتیجه نمودار فلوروسنت دستگاه درصورت وجود ژنوتایپ هموزیگوت برای الل وحشی (C/C) فقط در کانال HEX، در صورت وجود ژنوتایپ هموزیگوت برای الل جهش‌یافته (T/T) فقط در کانال FAM و در صورت وجود ژنوتایپ هتروزیگوت (C/T) هر دو کانال مشاهده می‌شود.

٤) محتوای کیت

کیت حاضر برای انجام ۲۴ تست تشخیصی است و دارای اجزای زیر می‌باشد:

	ریجنت‌ها*	مقادیر
۱	2X Master Mix	۱ تیوب X ۲۴۰ میکرولیتر
۲	C677T P&P Mix (Primer & Probe)	۱ تیوب X ۱۲۰ میکرولیتر
۳	No Template Control (NTC)	۱ تیوب X ۱۰۰ میکرولیتر
٤	Wildtype C+ (C677 Control)	۱ تیوب X ۱۰۰ میکرولیتر
۵	Heterozygote C+ (C677T Control)	۱ تیوب X ۱۰۰ میکرولیتر
٦	Mutant C+ (C677T Control)	۱ تیوب X ۱۰۰ میکرولیتر

*** توجه:**

- ✓ تمامی اجزای کیت در دمای ۱۵- تا ۲۵- درجه سانتیگراد نگهداری شوند.
- ✓ تاریخ انقضای کیت بر روی آن درج شده است.
- ✓ تا حد امکان از ذوب و فریز شدن اجزای کیت خودداری شود (کمتر از ۵ بار).
- ✓ در صورت نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتیگراد، در کمتر از دو هفته مورد استفاده قرار گیرد.
- ✓ در صورت نیاز از هرکدام از اجزا بر اساس نیاز الیکوت تهیه شود.
- ✓ تا حد امکان محلول حاوی پرایمر و پروب نشاندار شده با مواد فلوروسنت در معرض نور مستقیم قرار نگیرد.
- ✓ حتما قبل از استفاده از هرکدام از محلول‌های موجود در کیت، ورتکس/ اسپین انجام شود.

۵) سایر تجهیزات و مصرفی‌های لازم

	دستگاه / مصرفی	تعداد	توضیحات
۱	ورک استیشن (کابینت PCR)	۲ عدد	یکی برای تهیه PCR mix و دیگری برای اضافه کردن DNA انسانی استخراج شده و کنترل‌ها است.
۲	ست سمپلر با حجم‌های مختلف	۲ ست	هر یک ست در زیر هر ورک استیشن قرار داده شود.
۳	مینی اسپین / ورتکسر	۲ عدد	هر کدام در زیر هر ورک استیشن قرار داده شود.
٤	مینی اسپین با روتور استریپ خور یا سانتریفیوژ پلیت خور	۱ عدد	به منظور سانتریفوژ کردن استریپ تیوب‌ها یا پلیت حاوی واکنش PCR قبل از قرار دادن در دستگاه Real-time PCR استفاده می‌شود.
۵	دستگاه Real-time PCR	۱ عدد	دستگاه دارای قابلیت خوانش در حداقل ۲ کانال FAM و HEX یا معادل طول موج آن‌ها باشد.
٦	کول رک (کرایو رک)	به تعداد لازم	برای حمل و نگهداری بافرها و نمونه‌های RNA در حین کار استفاده می‌شود.
۷	استریپ تیوب یا پلیت مخصوص Real-time PCR	به تعداد لازم	بر اساس نوع دستگاه Real-time PCR از نوع سفید یا شفاف استفاده می‌شود.
۸	اسپری حاوی محلول از بین برنده نوکلئازها	به مقدار لازم	به منظور تمیز کردن سطوح و تمامی وسایل استفاده می‌شود.
۹	سر سمپلر فیلتر دار در حجم‌های مختلف	به تعداد لازم	باید عاری از DNase و RNase باشند.

٦) ایمنی زیستی

- ❑ در حین کار با نمونه‌های بالینی حتما از وسایل حفاظتی (مثل دستکش، گان، ماسک و عینک محافظ) استفاده شود.
- ❑ کار با نمونه‌های بالینی، حتما در زیر هود میکروبیولوژیکی کلاس ۲ یا بالاتر انجام گیرد.
- ❑ تمامی مراحل انجام کار باید توسط افراد آموزش دیده انجام شود.
- ❑ دور ریختن بافرها، ریجنت‌ها و نمونه‌ها بر اساس مقررات و گایدلاین‌های مربوطه انجام شود.

۷) نمونه‌ی بالینی مورد استفاده

خون کامل

- ✓ بهتر است خون گرفته شده درون لوله‌های حاوی مواد ضد انعقاد (مثل EDTA و سیترات) ریخته شود تا کارایی استخراج DNA افزایش یابد.
- ✓ نمونه‌های گرفته شده را می‌توان تا قبل از ۴۸ ساعت در دمای ۲- تا ۸- درجه‌ی سانتیگراد نگهداری نمود. در غیر اینصورت، نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتیگراد یا کمتر نگهداری شوند.
- ✓ کیت حاضر فاقد ریجنت‌های مربوط به استخراج DNA می‌باشد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود از یک کیت یا یک روش استخراج DNA مناسب (چه دستی و چه اتوماتیک) استفاده شود و DNAی استخراج شده‌ی حاصل بوسیله‌ی کیت حاضر مورد بررسی و آزمایش قرار گیرد.
- ✓ DNA استخراج شده از نمونه‌های بالینی را می‌توان به مدت حدود یکسال در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتیگراد نگهداری نمود.

۸) پروتکل انجام تست

۸-۱) در زیر یک ورک استیشن، اجزای کیت را مطابق جدول زیر درون یک میکروتیوب عاری از نوکلئاز با یکدیگر مخلوط نمایید تا میکس واکنش PCR بدست آید.

	اجزای واکنش*	حجم **
۱	2X Master Mix	۱۰ میکرولیتر
۲	C677T P&P Mix (Primer & Probe)	۵ میکرولیتر
	حجم نهایی	**۱۵ میکرولیتر**

* قبل از انجام تست تمامی اجزای کیت به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شوند تا به آرامی ذوب شوند. استفاده از کرایورک به منظور نگهداری محلول‌ها در این مرحله پیشنهاد می‌شود. سپس برای حل کردن و هموژن کردن محلول‌ها از ورتکس استفاده شود. در مرحله بعد، تمامی محلول‌ها اسپین شوند تا در صورتی که قطرات محلول روی درب تیوب‌ها باشد به ته میکروتیوب کشیده شود.

** مقادیر اورده شده در جدول به ازای یک نمونه (یک واکنش) هستند. در صورت استفاده از بیش از یک نمونه، تمامی مقادیر ضربدر تعداد نمونه‌ها شود. لازم به ذکر است که به ازای هر ۱۶ نمونه یک واکنش اضافی در نظر گرفته شود.

۸-۲) به ازای هر نمونه، مقدار **۱۵ میکرولیتر** از میکس واکنش را به هر چاهک از پلیت مخصوص Real-time PCR (یا هر تیوب از استریپ تیوب ۸تایی) اضافه نمایید.

۸-۳) در زیر یک ورک استیشن دیگر مقدار **۵ میکرولیتر** از هر یک از DNA استخراج شده از هر نمونه‌ی بالینی را به میکس مرحله‌ی قبل اضافه و اسپین نمایید.

نکات:

- ✓ در این مرحله، بطور موازی مقدار ۵ میکرولیتر از هر کدام از کنترل‌های مثبت (هموزیگوت وحشی، هتروزیگوت و هموزیگوت موتانت) و کنترل منفی (NTC) موجود در کیت را نیز به‌صورت جداگانه به چاهک حاوی میکس واکنش اضافه شوند.
- ✓ در حین انجام کار، به‌منظور حفظ کیفیت DNAهای استخراج شده، پس از خارج کردن آن‌ها از فریزر، آن‌ها را برروی کرایورک مخصوص حمل و نگهداری نمایید.

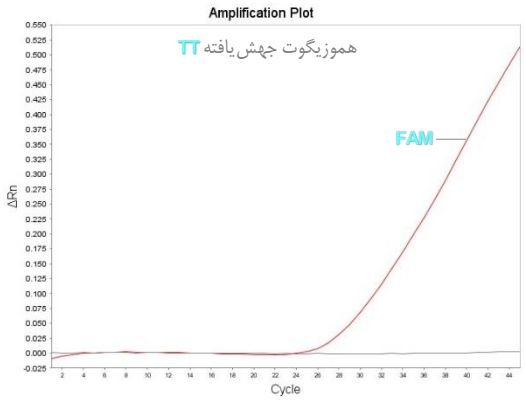
۸-٤) واکنش‌ها را به دستگاه Real-time PCR منتقل کرده و برنامه‌ی آورده شده در جدول زیر را اجرا نمایید

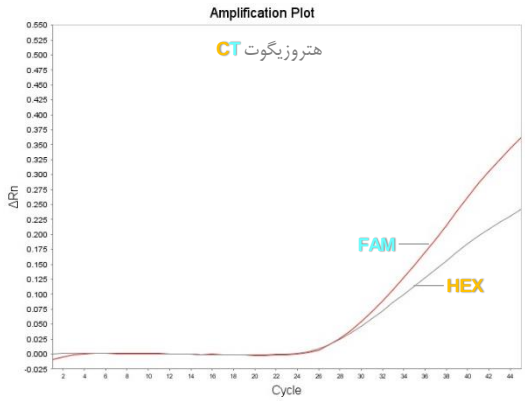
سیکل	مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	زمان (ثانیه)
۱ x	فعال شدن آنزیم پلیمراز	۹۵	۹۰۰
۴۰ x	باز شدن رشته‌های DNA الگو	۹۵	۱۰
	جفت شدن پرایمرها و سنتز رشته های جدید	۶۰	۳۰ *

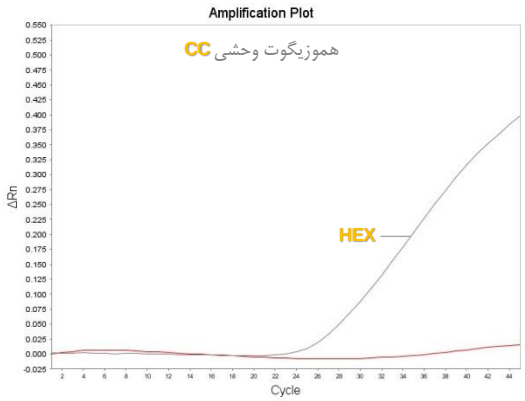
* خوانش فلوروسنت در کانال‌های FAM و HEX در این مرحله انجام شود.

۸-۵) بعد از انجام PCR، تفسیر نتایج بر اساس جدول زیر انجام شود.

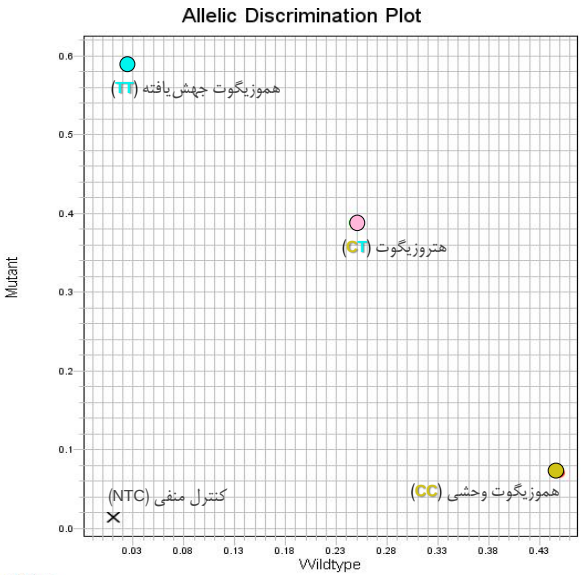
تفسیر	HEX	FAM
فرد مورد آزمایش برای جهش C677T در ژن *MTHFR* دارای ژنوتایپ هموزیگوت جهش یافته (TT) است.	–	+
فرد مورد آزمایش برای جهش C677T در ژن *MTHFR* دارای ژنوتایپ هتروزیگوت (CT) است.	+	+
فرد مورد آزمایش برای جهش C677T در ژن *MTHFR* دارای ژنوتایپ هموزیگوت وحشی (CC) است.	+	–
استخراج به‌درستی انجام نشده است و آزمایشات باید تکرار شوند.	–	–







- مقادیر Ct (Cq) کمتر از ۳۵ بعنوان مثبت و مقادیر بزرگتر از ۳۵ بعنوان منفی از نظر وجود الل در نظر گرفته شوند.
- پروب شناسایی کننده‌ی الل جهش یافته C677T با رنگ فلوروسنت FAM و پروب شناسایی کننده‌ی الل وحشی C677 با رنگ HEX نشاندار شده است.
- کیت حاضر دارای ۳ نوع نمونه‌ی کنترل مثبت (هموزیگوت وحشی CC، هتروزیگوت CT و هموزیگوت جهش‌یافته TT) است. مقادیر Ct هر دو کانال FAM و HEX برای کنترل‌های مثبت باید کمتر از ۳۵ باشند. نمونه‌ی کنترل منفی کیت حاضر آب عاری از نوکلئاز است که بعنوان No template control (NTC) در نظر گرفته می‌شود. در صورت وجود آلودگی ریجنت‌های کیت با نمونه‌ی DNA یا آلودگی‌های تکنیکی در حین آماده سازی واکنش PCR، ممکن است که رنگ فلوروسنت در کانال‌های مذکور برای نمونه‌ی NTC توسط دستگاه خوانش شود. در صورت مشاهده‌ی مقادیر Ct برای نمونه‌ی NTC پیشنهاد می‌شود تا آزمایشات تکرار شوند.
- علاوه بر آنالیز ذکر شده در بالا می‌توان از آنالیز Endpoint یا Allelic discrimination نیز استفاده نمود که نتایج حاصل باید مشابه نمودار زیر باشد:



- برای انجام آنالیز Endpoint، علاوه بر خوانش فوروسنت در حین PCR، باید خوانش فلوروسنت هم قبل از انجام PCR (Pre-PCR) و هم بعد از انجام PCR (Post-PCR) در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه نیز انجام شود (در دستگاه های ABI).

۹) محدودیت‌های تست

- هرگونه تغییرات در پروتکل پیش رو ممکن است باعث ایجاد خطا در نتایج حاصله شود.
- تست حاضر باید توسط افراد متخصص آموزش دیده انجام شود.
- نتایج قابل اطمینان بستگی به جمع‌آوری، حمل، ذخیره و نگهداری مناسب دارد.
- این روش نباید به‌طور مستقیم بر روی نمونه‌های بیمار انجام شود. قبل از انجام تست، حتما باید با استفاده از یک روش مناسب استخراج DNA از نمونه انجام شود.
- مهارکننده‌های موجود در حین فرآیند استخراج DNA می‌توانند مانع از انجام PCR شوند.

۱۰) علائم اختصاری

REF کاتالوگ نامبر	RUO جهت مصارف تحقیقاتی
حاوی دستورالعمل	تاریخ انقضا
محدوده دمای نگهداری	LOT لات نامبر
کمپانی تولید کننده	تعداد تست‌ها

۱۱) منابع

1. Frosst, P. *et al., Nat Genet* **10**, 111-113, (1995).
2. Keijzer, M. B. *et al., Thromb Haemost* **88**, 723-728, (2002).
3. Kowa, H. *et al., Am J Med Genet* **96**, 762-764, (2000).
4. Rozen, R. J, *Inherit Metab Dis* **19**, 589-594, (1996).
5. Hustad, S. *et al., Am J Hum Genet* **80**, 846-855, (2007).

DELTA BIOTECHNOLOGY
دلسا تشخیص آریا (دلتا)
آدرس: کاشان، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز رشد فناوری
شماره تماس: ۰۳۱۹۱۰۱۰۶۵۱ ۰۲۱۹۱۰۱۰۶۵۱
وبسایت: www.deltabiotechno.com