

Nome del prodotto

Kit di rilevamento per polimorfismo del gene MTHFR umano (PCR-Fluorescence Probing)

Valutazione dell'imballaggio

24 test/kit, 48 test/kit, 96 test/kit

Inteso Use

Questo kit viene utilizzato per il rilevamento qualitativo del polimorfismo del gene MTHFR C677T nel DNA genomico di campioni di tamponi orali umani e i campioni di tampone orale possono essere utilizzati direttamente per il rilevamento senza estrazione di acido nucleico.

Il gene della 5,10-metilenetetraidrofolato reductasi (MTHFR) è un enzima chiave nella sintesi del DNA umano e nel metabolismo dell'omocisteina (Hcy), catalizzando la conversione del 5,10-metilenetetraidrofolato in 5-metil tetraidrofolato, che è un donatore di metile per la conversione di Hcy in metionina. La mutazione MTHFR C677T può causare il cambiamento dell'amminoacido da esoso codificato da alanina a valina, con conseguente diminuzione della resistenza al calore e dell'attività enzimatica. Il rischio di malattie vascolari è aumentato [1]; D'altronde, porta a disturbi del metabolismo dell'acido folico, che aumenta notevolmente il rischio di difetti del tubo neurale fetale nel primo trimestre [2]. I risultati dei test di questo kit forniscono una diagnosi ausiliaria per i gruppi ad alto rischio con bassa attività di metilenetetraidrofolato reductasi.

I risultati dei test sono solo di riferimento clinico e non possono essere utilizzati da soli come base per confermare o escludere i casi.

Principio di prova

Il suo kit viene utilizzato per digitare e rilevare il sito di polimorfismo C677T del gene MTHFR umano e una serie di primer e sonde specifici sono progettati nel sistema di reazione. Le sonde si distinguono etichettando diversi fluorofori all'estremità 5' e le loro sequenze contengono basi che corrispondono a genotipi diversi. Le discrepanze di base ridurranno notevolmente la capacità di legame delle sonde al modello e la probabilità di essere scisse. Pertanto, quando il genotipo è omozigote, lo strumento rileva solo un singolo segnale fluorescente e, per gli eterozigoti, vengono rilevati entrambi i segnali fluorescenti (Immagine 1).

Questo sistema di reazione contiene misure anti-inquinamento dell'enzima dUTP-UDG per evitare risultati falsi positivi; viene fornito uno standard interno per evitare risultati falsi negativi.

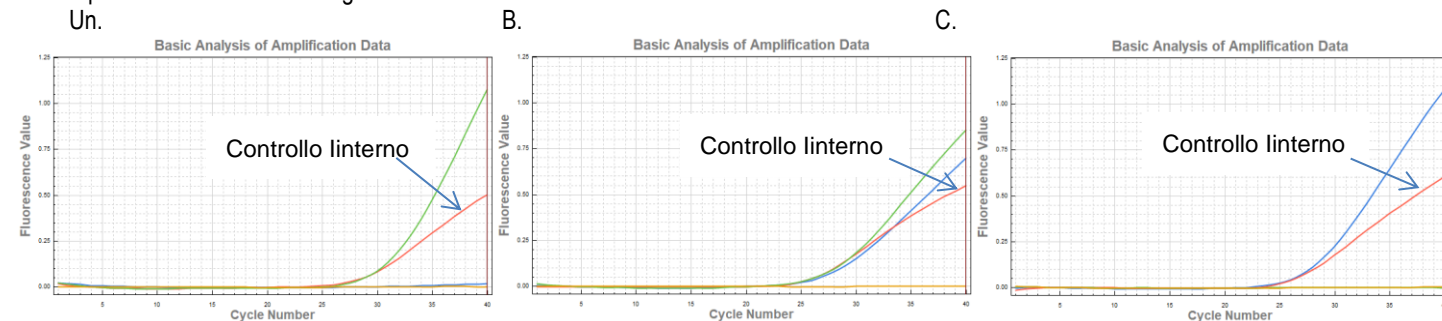


Figura 1. Diagramma schematico dei risultati dei test di genotipizzazione. Un. Tipo selvatico (MTHFR 677CC); B. Hmutante eterozigote (MTHFR 677CT); C. Hmutante omozigote (MTHFR 677TT)

Componenti principali

1. Componenti del reagente inclusi nel prodotto:

I componenti principali di questo kit sono mostrati come mostrato nella tabella seguente. Se i componenti in diversi lotti di kit sono intercambiabili.

Elementi	Nome	Spec.(48 test/ kit)	Spec.(96 test/ kit)	Costituenti
Kit di amplificazione PCR	Buffer PCR	1,9mL ×1 Tubo	1,9mL ×2 Tubo	Primer, sonde, dNTPs, ecc.
	Polimerasi Mix	50µL×1 Tubo	Tubo 100µL×1	DNA polimerasi, UDG
Controllo qualità	PC-CC	200µL×1 Tubo	400µL×1 Tubo	Frammento del gene Target
	PC-CT	200µL×1 Tubo	400µL×1 Tubo	Frammento del gene Target
	PC-TT	200µL×1 Tubo	400µL×1 Tubo	Frammento del gene Target
	Control negativo	200µL×1 Tubo	400µL×1 Tubo	Terreno di coltura cellulare

2. Componenti del reagente non inclusi nel prodotto, ma necessari per questa prova:

Kit di campionamento del tampone orale richiesto: La soluzione di conservazione del campione deve essere normale salina, si consiglia di utilizzare il kit di campionamento del tampone orale prodotto da Singuway Technology Co., Ltd.

Materiali di consumo richiesti: tubo speciale fluorescente PCR a parete sottile, si consiglia di utilizzare i prodotti pertinenti di Axygen, selezionare i materiali di consumo corrispondenti in base all'uso dello strumento.

Condizioni di conservazione e validità

Il kit deve essere conservato alla temperatura di $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ al buio ed evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti (in caso di congelamento e scongelamento, non devono superare le 4 volte), con un periodo di validità di 12 mesi. Può essere conservato a $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ dopo l'apertura del coperchio, con un periodo di validità di 30 giorni. Il kit deve essere trasportato in una ghiacciaia.

Strumenti applicabili

Uno strumento PCR in tempo reale contenente almeno tre canali di fluorescenza a colori, come Singuway serie Singu9600, Tianlong Gentier96, Bio-rad CFX96, ABI 7500, Roche Light Cycle 480.

Requisito del campione

1. Tipo di campione: Questo kit è adatto per la rilevazione del DNA genomico in campioni di tamponi orali umani.

2. Metodo di raccolta dei campioni

2.1 Collutorio (preparazione): il collettore indossa una maschera monouso e guanti e utilizza una tazza usa e getta per prendere una quantità appropriata di acqua affinché il collettore faccia i gargarismi 1-2 volte per rimuovere i detriti in bocca.

2.2 Raccolta (pulizia): Estrarre il bastoncino di raccolta, pulire la mucosa buccale della persona da raccogliere e ruotarlo 5 volte per garantire che i campioni cellulari possano essere prelevati da ciascun lato del bastoncino di raccolta. All'interno del tubo di campionamento, scartare la coda e stringere il cappuccio del tubo.

2.3 Conservazione del campione: i campioni raccolti da sottoporre a prova devono essere sottoposti all'ispezione in tempo. I campioni devono essere conservati a temperatura ambiente per non più di 72 ore e conservati a $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ per più di 72 ore. Il congelamento e lo scongelamento ripetuti non devono superare le 3 volte.

Metodo di prova

1. I tamponi orali possono essere utilizzati direttamente per il rilevamento senza estrazione di acidi nucleici.

2. Preparazione del reagente PCR (nell'area di preparazione del reagente)

2.1 Estrarre il buffer PCR dal kit, scongelare completamente a temperatura ambiente, vortice e mescolare bene e centrifugare brevemente per un uso successivo; Gli enzima Mix d non devono essere scongelati, estratti e centrifugati per un uso successivo.

2.2 Preparare la soluzione di reazione PCR secondo la seguente composizione ("n" è il numero di reazioni necessarie): aggiungere $39\mu\text{L}\times n$ PCR Buffer e $1\mu\text{L}\times n$ Poliasi Mix in un nuovo tubo e mescolare bene.

2.3 Miscelare nuovamente la soluzione di reazione PCR preparata nella fase precedente e quindi imballare separatamente $40\mu\text{L}/\text{tubo}$ nel tubo di reazione PCR. Transfer il tubo di reazione contenente la soluzione di reazione PCR all'area di elaborazione del campione

3. Aggiungo campioni (nell'area di elaborazione del campione)

Miscelare accuratamente la provetta di campionamento del tampone orale, il controllo positivo e il controllo negativo, undd $10\mu\text{L}$ al tubo di reazione PCR. Coprire il cappuccio, miscelare bene ed eseguire una breve rotazione per consentire alla soluzione di reazione di affondare sul fondo del tubo.

4. Amplificazione PCR (nell'area di prova di amplificazione)

4.1 Caricare i tubi di reazione PCR nello strumento PCR in tempo reale per l'amplificazione.

4.2 Configurazione del programma di amplificazione:

Passo	Ciclo	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (min:sec)	Raccogli il segnale di fluorescenza
1	1	50	02:00	No
2	1	95	3:00	No
3	42	95	0:10	No
		57	0:20*	Si

*: Impostato su 32 secondi su ABI7500.

Selezione del canale di rilevamento dello strumento:

Channel	FAM	ESAGONALE/VIC	ROX
Signal	MTHFR677 T	MTHFR677 C	IC

5. Standard QC

5.1 Controllo negativo: i risultati del canale FAM, HEX/VIC sono negativi, mentre il risultato del canale ROX è positivo e $\text{Ct}\leq 37$.

5.2 Controllo positivi: i risultati dei canali FAM, HEX/VIC, ROX sono positivi e $\text{Ct}\leq 37$.

5.3 Gli elementi di cui sopra devono essere soddisfatti contemporaneamente in un esperimento, altrimenti questo esperimento non è valido e l'esperimento dovrebbe essere ripetuto.

6. Analisi dei risultati

6.1 Dopo l'esperimento, analizzare secondo il software degli strumenti correlati, regolare la tolleranza al rumore al di sopra del rumore di base.

6.2 Il principio di impostazione della soglia è che la linea di soglia supera di poco il punto più alto della normale curva di controllo negativa (linea di rumore irregolare), 6-15 aree di circolazione sono state generalmente selezionate per la linea di base.

6.3 Registrare il valore Ct del campione calcolato mediante l'analisi automatica dello strumento.

Risultato

Sulla premessa che l'esperimento soddisfa i requisiti di controllo della qualità, i risultati sono giudicati secondo la seguente tabella:

Tabella 1. Il giudizio di risultati diversi.

Genotipo	Canale	FAM	ESAGONALE/VIC	ROX
Tipo selvatico (MTHFR 677CC)		$\text{Ct}>37$ o nessun valore Ct	$\text{Ct}\leq 37$	$\text{Ct}\leq 37$
Hmutante eterozigote (MTHFR 677CT)		$\text{Ct}\leq 37$	$\text{Ct}\leq 37$	
Hmutante omozigote (MTHFR 677TT)		$\text{Ct}\leq 37$	$\text{Ct}>37$ o nessun valore Ct	

Valore di cut-off (CO) o intervallo di riferimento

Il test copre un totale di 200 campioni di wild type, mutanti eterozigoti e mutanti omozigoti. La curva delle caratteristiche operative del ricevitore (ROC) viene utilizzata per l'analisi e si determina che il valore di riferimento di questo kit è uguale al valore Ct di 37.

Limitazioni del metodo di test

Questo kit è adatto solo per i tipi di campione specificati (compresi i metodi di elaborazione) e i sistemi di rilevamento. I risultati dei test sono solo di riferimento clinico e non devono essere utilizzati come unica base per la diagnosi clinica e il trattamento. Se ci sono altre variazioni genetiche nei primer e nelle regioni della sonda di questo kit, potrebbe causare risultati anormali.

Indice di performance del prodotto

1. Tasso di conformità di riferimento positivo

Sono stati rilevati 6 riferimenti aziendali positivi P1~P6 tra cui il tipo wild, mutante omozigote e mutante eterozigote e ogni test è stato eseguito una volta. I risultati dovrebbero essere tutti positivi e il tasso di coincidenza è stato del 100%.

2. Tasso di conformità di riferimento negativo

Sono state testate 4 imprese di riferimento negativo N1 ~ N8 e ogni test è stato eseguito una volta. I risultati dovrebbero essere tutti negativi e il tasso di coincidenza è stato del 100%.

3. Limite minimo di rilevamento (sensibilità di analisi):

La sensibilità al saggio di questo reagente era di 2000 copie/mL.

Rileva il tipo di ild, mutante omozigote e mutante eterozigote con la concentrazione di 2000Copie/mL di riferimento di sensibilità aziendale L1~L3. Ogni test viene ripetuto 10 volte e i risultati dovrebbero essere positivi a 10 volte.

4. Precisione

Un riferimento di precisione aziendale con 1×10^5 copie/mL di campione di mutante eterozigote H (MTHFR 677CT) wcome eseguito per 10 test e il CV del valore Ct non era superiore al 5%.

5. Rispondo all'interferenza:

L'1% di sangue intero non interferisce con il rilevamento di questo kit. Le sostanze interferenti esogene come collutorio, dentifricio, levamisolo, aciclovir e interferone non interferiscono con i risultati dei test di questo kit.

Avviso

1. Questo prodotto viene utilizzato solo per la diagnosi in vitro; leggere attentamente questo manuale prima dell'uso.

2. Al fine di evitare qualsiasi potenziale pericolo biologico nel campione, il campione di prova è considerato una sostanza infettiva per evitare il contatto con la pelle e le mucose; si raccomanda di utilizzare il campione nell'armadio di biosicurezza che può impedire il deflusso di nebbia d'aria e il funzionamento e il trattamento del campione devono soddisfare i requisiti delle leggi e dei regolamenti pertinenti.

3. La sostanza di controllo positiva del kit è l'acido nucleico sintetico artificiale che non ha potenziale infettività; Sebbene abbia superato i test di HBs-Ag, HIV1/2-Ab, HCV-Ab e altri articoli, fino ad ora, non esiste un test in grado di garantire la sicurezza assoluta, quindi i componenti di cui sopra devono essere trattati come sostanza infettiva durante il funzionamento.

4. Gli operatori sperimentali devono aver ricevuto la formazione professionale di amplificazione genica o di individuazione di metodi biologici molecolari e possedere la pertinente qualifica di funzionamento sperimentale. Il laboratorio è dotato di adeguati impianti di prevenzione della biosicurezza e procedure di protezione e la gestione del laboratorio deve essere effettuata in stretta conformità con le specifiche di gestione dei pertinenti laboratori nazionali di biologia molecolare e dei laboratori clinici di amplificazione genica. Il processo sperimentale deve essere effettuato in diversi settori quali l'area di preparazione dei reagenti, l'area di preparazione dei campioni, l'area di amplificazione e l'area di analisi del prodotto. In ogni fase dell'operazione sperimentale devono essere utilizzati strumenti e attrezzature speciali, e le forniture in ciascuna fase di ciascuna zona non sono utilizzate in modo intercambiabile.





















5. Ogni componente del kit deve essere completamente fuso e scosso prima dell'uso, ma è necessario evitare ripetuti congelamenti-scongelamenti (in caso di congelamento e scongelamento, non devono superare le 4 volte). Il reagente nel tubo della centrifuga deve essere centrifugato per alcuni secondi prima dell'uso.

6. Quando i reagenti sono confezionati separatamente, le bolle devono essere evitate per quanto possibile. Prima di caricare, si prega di prestare attenzione a verificare se il coperchio di ciascun tubo di reazione è stretto, in modo da evitare perdite di sostanze fluorescenti e contaminazione dello strumento.

7. Dopo l'analisi, le superfici e gli strumenti di lavoro vanno trattate con ipoclorito di sodio (50ppm ~ 2000ppm) o alcool al 75% e lampada a raggi ultravioletti.

8. I rifiuti sanitari generati nel test devono essere trattati in conformità con le normative locali.

Simboli

Etichetta	Istruzione	Etichetta	Istruzione	Etichetta	Istruzione
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro		Cautela		Catalogo ue number
	Consultare le istruzioni per l'uso		Non riutilizzare		Codice lotto
	Rischi biologici		Keep secco		Data di fabbricazione
	Oggetti fragili, maneggiare con cura		Fabbricante		Data di scadenza
	Ascensionale		Contiene un numero sufficiente per i test <n>		Non utilizzare se la confezione è danneggiata
	Limite di impilamento per numero		Limite di temperatura		Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea
	Ombreggiamento		Marchio CE		

Referenze

1. Qian X, Lu Z, Tan M, Liu H, Lu D, et al. Una meta-analisi dell'associazione tra polimorfismo C677T nel gene metilene-tetraidrofolato riduttasi e ipertensione. European Journal of Human Genetics 2007(15), 1239-1245.

2. Wang Y, Liu Y, Ji W, et al. Varianti nel gene MTHFR e nella suscettibilità ai difetti del tubo neurale in Cina. Metab Brain Dis. 2015 Agosto;30(4):1017-26.

Informazioni di base

Produttore: SINGUWAY BIOTECH INC.

Aggiungi: B1302, Life Science Park, Shen Cheng Tou Innovation Factory, Julongshan A Road, Xiuxin Community, Kengzi Street, Pingshan District, Shenzhen City, 518122 Guangdong, P.R. Cina

Tel: +86-755-23704711 Web: www.singuway.com

CMC Medical Devices & Drugs SL

Aggiunto: C/ Horacio Lengo N° 18, CP 29006, Málaga, Spagna

Telefono: +34951214054 Fax: +34952330100

C/Horacio Traquardo N° 18, CP 29006, Malaga-Spagna

Data di approvazione e data di modifica del disciplinare

Gennaio 15, 2022