



**SIMBIOLAB**

**SimPCR™ MTHFR A1298C Genotyping Kit**

Cat. No:SBL12-1131/25

## محتویات کیت:

عنوان برچسب	مقادیر در کیت	اجزا
Reaction Mix	۵۰۰ µl	مسترمیکس
Oligomix A	۱۰۰ µl	الیگومیکس نرمال
Oligomix B	۱۰۰ µl	الیگومیکس مونات
Control A	۲۰ µl	کنترل هموزیگوت نرمال
Control B	۲۰ µl	کنترل هتروزیگوت
Control C	۲۰ µl	کنترل هموزیگوت مونات

## پروتکل

### الف) استخراج DNA ژنومی

جداسازی اسید نوکلئیک با کیت استخراج DNA از خون SimBioLab (SBL15-2005) یا سایر کیت های استخراج موجود در بازار طبق پروتکل های استاندارد انجام می شود. DNA استخراج شده را می توان برای چندین ماه در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری کرد.

### ب) آماده سازی میکس PCR

برای هر واکنش PCR دو میکس جداگانه (یکی برای آلل نرمال و دیگری برای آلل مونات) آماده شود. برای هر ران واکنش PCR، یک ترکیب اصلی با حجم مناسب برای نمونه منفی، نمونه مثبت و نمونه های آزمایشی (n+1) آماده کنید اجزای واکنش باید مطابق نسبت های داده شده در جدول مخلوط شوند:

اجزا واکنش	حجم/واکنش
مسترمیکس	۱۰ µl
الیگومیکس نرمال	۴ µl

اجزا واکنش	حجم/واکنش
مسترمیکس	۱۰ µl
الیگومیکس مونات	۴ µl

۱۴ میکرولیتر از میکس آماده شده را به هر میکروتیوب اضافه کرده و ۲-۵ میکرولیتر DNA استخراج شده یا DNA کنترل را به آن ها اضافه کنید. سپس آب مقطر استریل را تا حجم ۲۰ میکرولیتر آب به هر واکنش اضافه کرده و داخل دستگاه PCR قرار دهید.

## معرفی کیت :

متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز (MTHFR) یک آنزیم تنظیم کننده کلیدی در متابولیسم فولات و هموسیستئین است. این آنزیم، با تبدیل ۵، ۱۰-متیلن تتراهیدروفولات به ۵-متیل تتراهیدروفولات، بستری برای متیلاسیون مجدد هموسیستئین به متیونین را کاتالیز می کند. جهش در این ژن ، از جمله واریانت های C677T و A1298C (به ترتیب ۶۵-۲۰٪ و ۲۰-۱۵٪) سبب کاهش فعالیت آنزیم می شود. این پلی مورفیسم ها از مهمترین عوامل ژنتیکی تأثیر گذار بر متابولیسم هموسیستئین هستند، که با چندین اختلال پیچیده از جمله ترومبوز شریانی، آنرواسکلروز، بیماری عروق کرونر قلب، نقص لوله عصبی، چندین نوع سرطان، تداخلات دارویی نامطلوب و پوکی استخوان مرتبط اند. تشخیص این پلی مورفیسم ها می تواند به انتخاب درست داروها کمک کند و از تجویز داروهای بی عوارض جانبی نامطلوب، در افراد دارای آنزیم ضعیف MTHFR جلوگیری کند. علاوه بر این، ژنوتیپ MTHFR می تواند به پزشکان در پیش بینی خطر ترومبوز ورید عمقی و همچنین خطر سقط مکرر کمک کند.

## اساس کار:

کیت MTHFR A1298C genotyping با بهره گیری از تکنیک ARMS-PCR به منظور تعیین ژنوتیپ MTHFR A1298C SNP طراحی شده است.

تشخیص جهش بر اساس تقویت ناحیه خاص ژنوم با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوط به آلل های نرمال (A1298) و جهش یافته (C1298) می باشد. تکثیر این آللها با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز مورد بررسی و تایید قرار می گیرد. علاوه بر این یک جفت پرایمر کنترل داخلی برای اطمینان از صحت واکنش PCR در واکنش پیش بینی شده است که وجود محصول مربوطه به آن صحت واکنش را تایید می کند.

## ج) برنامه واکنش PCR

دستگاه PCR را طبق پروفایل دمایی زیر تنظیم کنید:

Step	Temp	Time	Cycle
Initial activation	95°C	5 min	1 X
Denaturation	95°C	30 s	35-40 X
Annealing	61°C	30 s	
Extension	72°C	40 s	
Final Extension	72°C	5 min	1 X

## د) بررسی محصولات PCR با الکتروفورز ژل آگارز

۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR را در کنار یک DNA ladder (۱۰۰ جفت بازی) روی ژل آگارز ۲ درصد ران کنید.

**توجه- به منظور سهولت تفسیر نتایج لوله های مربوطه به واکنش های اختصاصی آلل هر نمونه در کنار هم الکتروفورز شود.**

محصول PCR مربوطه به پرایمرهای MTHFR A1298C یک باند تقریباً ۲۵۰ جفت باز را ایجاد می کند و پرایمرهای کنترل داخلی قطعه ای به طول تقریباً ۹۰۰ جفت باز را تقویت می کنند.

نتایج حاصل از الکتروفورز را بر اساس جدول زیر تفسیر کنید:

واکنش آلل موتانت		واکنش آلل نرمال		
باند اختصاصی آلل	باند کنترل داخلی	باند اختصاصی آلل	باند کنترل داخلی	
-	+	+	-/+	هموزیگوت نرمال
+	-/+	-	+	هموزیگوت موتانت
+	-/+	+	-/+	هتروزیگوت
-	-	-	-	غیر قابل قبول (تکرار واکنش)
+	-/+	-	-	غیر قابل قبول (تکرار واکنش)
-	-	+	-/+	غیر قابل قبول (تکرار واکنش)

آدرس: ایران، مشهد، پژوهشکده بوعلی، اتاقهای تمیز مرکز رشد فناوری سلامت

همراه: +98 915 383 14 07

تلفن: +98 372 55 495

Web address: [www.simbiolab.co](http://www.simbiolab.co)

E-mail: [info@simbiolab.co](mailto:info@simbiolab.co)