SimPCR™ MTHFR C677T Genotyping Kit

Cat. No: SBL12-1130/25

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 سبب کاهش فعالیت آنزیم می شود. در میان جهش های ایجاد شده، واریانت های C677T و A1298C (به ترتیب ۶۵-۳۰٪ و ۳۰-۱۵٪)کاهش فعالیت را نشان می دهند. این پلی مورفیسم ها از مهمترین عوامل ژنتیکی تعیین کننده هموسیستئین کل پلاسما هستند. به دلیل تأثیر آنها بر متابولیسم هموسیستئین، آنها با چندین اختلال پیچیده از جمله ترومبوز شریانی، آترواسکلروز، بیماری عروق کرونر قلب، نقص لوله عصبی، چندین نوع سرطان، تداخلات دارویی نامطلوب و پوکی استخوان مرتبط شده اند، اگرچه یافته ها هنوز بحث برانگیز هستند. بسته به پیشینه قومی، تا ۵۰ درصد از جمعیت ممکن است حامل آلل متغیر MTHFR باشند. تشخیص این پلی مورفیسم ها می تواند به پزشکان در پیش بینی خطر ترومبوز وریدعمقی و همچنین سقط مکرر و تشخیص درست دارو کمک کند.

اساس کار:

کیت تعیین ژنوتیپ MTHFR C677T براساس فرآیند تکثیر DNA با استفاده از فناوری Allele Specific PCR به منظورتعیین ژنوتیپ MTHFR C677T SNP طراحی شده است.

تشخیص جهش بر اساس تقویت ناحیه خاص ژنوم با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوط به آلل های نرمال C677 و جهش یافته T677 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

محتویات کیت:

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

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

اجزا واکنش	حجم/واکنش
مسترمیکس	۱۰µl
الیگومیکس نرمال	٤ µl

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

14 میکرولیتراز میکس آماده شده را به هر میکروتیوب اضافه کرده و ۵-۲میکرولیتر DNA استخراج شده را به لوله اضافه کنید. میکروتیوب را ورتکس و اسپین کرده و داخل دستگاه PCR قرار دهید.

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	55˚C	30 s	
Extension	72˚C	30 s	
Final Extension	72˚C	5 min	1 X

د) بررسی محصولات PCR با الکتروفورز ژل آگارز

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

توجه- به منظور سـهولت تفسـیر نتایج لوله های مربوطه به واکنش های اختصاصی آلل هر نمونه در کنار هم الکتروفورز شود.

محصـــول PCR مربوطه به پرایمرهای MTHFR A1298C یـک بـانـد تقریبـاً ۲۶۰ جفـت بـاز را ایجـاد می کنـد و پرایمرهای کنترل داخلی قطعه ای به طول تقریبا ۳۵۰ جفت باز را تقویت می کنند.

نتایج حا صل از الکتروفورز را بر ا ساس جدول زیر تفـسیر کنید:

	واکنش آلل نرمال		واکنش آلل موتانت	
	باند کنترل داخلی	باند اختصاصی آلل	باند کنترل داخلی	باند اختصاصی آلل
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 رشدفناوری سلامت

همراه: ۰۷ ۱٤ ۳۸۳ ۹۱۵ ۹۸+

تلفن:٤٩٥ ٥٥ ٣٧٢ ٩٨+

Web address: www.simbiolab.co

E-mail: info@simbiolab.co