راهنمای کیت فاکتور ۲

جهت تشخیص جهش Factor II (G20210A)

به روش Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene 6000/Q

مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-15-101
ویرایش ۱/۲
دی ۱۳۹۸

Novin Gene

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. دستورکار PCR ۶

۱۱.تنظیم دستگاه Rotor-Gene ۷

۱۲. آنالیز نتایج ۸

کیت Factor II RG به منظور تشخیص جهش G20210A در ژن پروترومبین در DNA انسانی می باشد و جهت استفاده با دستگاه Rotor-Gene طراحی شده است. این کیت مخصوص کاربرد تحقیقاتی است.

۱. مقدمه

پروترومبین یا فاکتور ۲ پیش ساز ترومبین در فرایند انعقاد خون است. جهش G20210A در ژن پروترومبین بعد از فاکتور ۵ لیدن، شایع ترین عامل ژنتیکی ترومبوآمبولی وریدی venous thromboembolism (VTE) می باشد. این جهش خطر وقوع VTE را دو تا هفت برابر افزایش می دهد. همچنین باعث افزایش احتمال سقط جنین نیز می شود. میزان شیوع این جهش در جوامع مختلف، متفاوت و بین نیم تا پنج درصد متغیر می باشد. تشخیص این جهش تنها از طریق بررسی DNA مربوط به ژن فاکتور ۲ (F2) ممکن است.

کیت فاکتور ۲ برای تشخیص جهش G20210A به روش Real-Time PCR و با استفاده از دستگاه Rotor-Gene طراحی و تولید شده است.

در این روش همزمان با انجام PCR، محصول آن با استفاده از پروب های فلورسانت شناسایی می شود. بنابرین پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی نبوده، علاوه بر کاهش زمان کار، از ایجاد آلودگی نیز پیشگیری میشود.

۲. محتویات کیت

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

برچسب	محتوا	حجم
F2 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 عدد، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند.
در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضای 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 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.
- هنگام استفاده مواد کیت را روی یخ خرد شده قرار دهید تا کاملا ذوب شده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات 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 یخهای 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 فاکتور ۲ 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 بیلیروبین (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. کنترل داخلی

هر فرد حامل ژن طبیعی یا جهش یافته F2 و یا هر دو آنها می باشد. بنابراین همیشه باید نتیجه این آزمایش دست کم برای یکی از انواع طبیعی یا جهش یافته ژن مثبت باشد. در نتیجه این آلل ها خود به عنوان کنترل داخلی این آزمایش عمل می کنند. در صورتی که فردی برای هر دو آلل طبیعی و جهش یافته منفی باشد، واکنش ناموفق بوده و آزمایش باید تکرار شود.

۹. استخراج DNA

برای استخراج DNA از روشها و کیت های مختلفی می توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت های 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)

۱۰.دستورکار PCR

ابتدا تمامی محتویات کیت را روی یخ خرد شده قرار دهید تا بطور کامل مواد داخل آنها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شده مواد داخل

آن ها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.

تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، سه لوله برای شاهدهای مثبت و یک لوله نیز برای شاهد منفی در نظر بگیرید.

به هر لوله ۲۰ میکرولیتر از F2 Mix اضافه کنید. سپس ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده و یا شاهد یا آب به هر لوله اضافه نمایید و درپوش لوله ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید. رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۱. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

- 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 عملکرد این دستگاه بین ۲۰ الی ۲۵ درجه سانتیگراد می باشد!

دستگاه را توسط کابل مخصوص آن با کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق وصل کنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

در لوح فشرده همراه کیت روی فایل F2 RG 0.2 و یا F2 RG 0.1 (با توجه به نوع میکروتیوب استفاده شده) دو بار 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 فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید 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 30 sec*	
	72°C x 15 sec	
3	**95°C x 15 sec**	1
4	**40°C x 10 min**	1
5	**Melt 42°C-75°C ***	1

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

PCR Mix موجود در کیت فاقد ROX می باشد.

۱۲. آنالیز نتایج

برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Analysis، Melt 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 (۴۸ تا ۴۹ درجه) نماینده آلل طبیعی (W) و قله سمت راست (۵۸ تا ۵۹ درجه) نماینده آلی جهش یافته (M) یا G20210A می باشد.

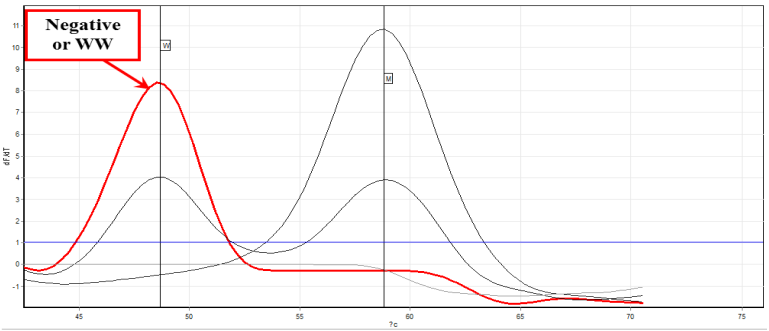
نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید.

- در صورتی که نمونه فقط دارای یک قله در دمای ۴۸ تا ۴۹ درجه باشد از نظر جهش G20210A منفی است و هموزیگوت سالم (WW) محسوب می شود.
- در صورتی که نمونه فقط دارای یک قله در دمای ۵۸ تا ۵۹ درجه باشد از نظر جهش G20210A مثبت است و هموزیگوت (MM) محسوب می شود.
- در صورتی که نمونه دارای یک قله در دمای ۴۸ تا ۴۹ درجه و یک قله در دمای ۵۸ تا ۵۹ درجه باشد از نظر جهش G20210A مثبت است و هتروزیگوت (MW) محسوب می شود.

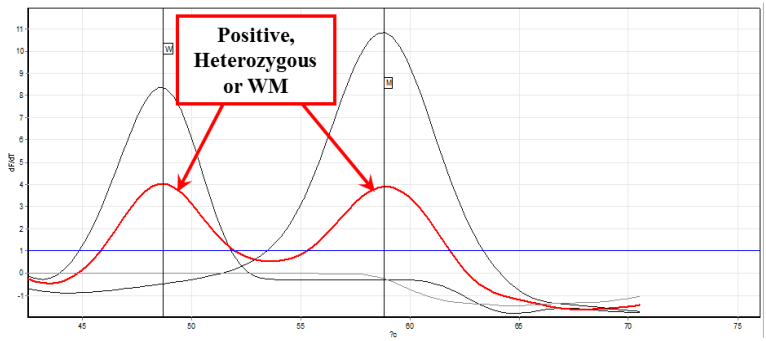
در شرایط زیر آزمایش غیر معتبر بوده و باید تکرار شود:

- در صورتی که یک نمونه هیچ قله ای در دمای ۴۸ تا ۴۹ یا ۵۸ تا ۵۹ درجه نباشد.
- در صورتی که برای نمونه منفی یا NTC یک قله (در هر دمایی) مشاهده شود.

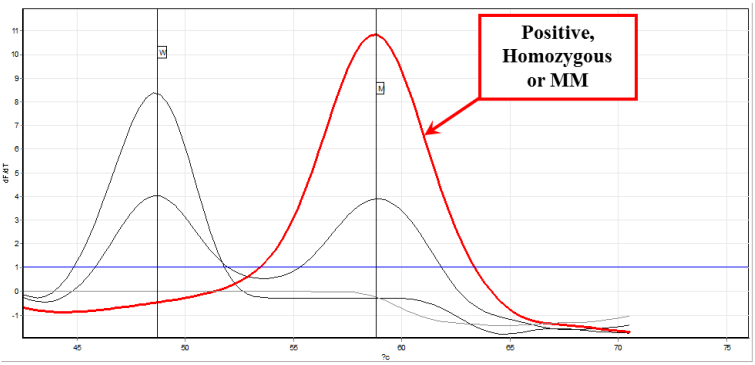
برای تعیین ژنوتیپ هر نمونه همچنین می توان در صفحه آنالیز، در منوی سمت راست هر قله را با عنوان W و M تعریف نمود. برای توضیحات بیشتر در این زمینه به راهنمای Rotor-Gene مراجعه نمایید. در تصاویر ۱، ۲ و ۳، نتایج منحنی مربوط به هر یک از انواع نمونه ها نشان داده شده است



تصویر ۱: منحنی مربوط به نمونه منفی یا WW



تصویر ۲: منحنی مربوط به نمونه مثبت هتروزیگوت یا WM



تصویر ۳: منحنی مربوط به نمونه مثبت هموزیگوت یا MM

Factor II RG Kit Manual

For Real-Time PCR Detection of FactorII (G20210A) mutation

For use with Rotor-Gene 6000
(Corbett Research)

Research use only

NG-WI-ASL-15-101
Version 1.2
Desamber 2019

Novin Gene

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 4

7. Interfering substances 5

8. DNA isolation 5

9. Internal Control (IC) 5

10. PCR Protocol 5

11. Programming of Rotor-Gene6000 6

12. Data Analysis 6

Factor II RG kit is intended for the detection of prothrombin G20210A mutation in human DNA with Rotor-Gene machine. This kit is intended for research use only

1. Introduction

Prothrombin or factor II is the precursor for thrombin in the coagulation cascade. G20210A mutation in prothrombin gene is the second most prevalent genetic risk factor for venous thromboembolism (VTE) after Factor V Leiden. This mutation increases the risk of venous thrombosis about 2 to 7 times. It has also been linked to increased risk of pregnancy loss. Prevalence of this mutation ranges between 0.5 to 5% depending on the race and ethnic background.

The diagnosis of factor II G20210A mutation requires DNA analysis of *F2*, the gene encoding factor II.

F2 RG kit provides a ready-to-use Real-Time PCR system for detection of G20210A mutation with Rotor-Gene machine. This method applies fluorescent probes allowing detection and analysis of amplified product while the reaction is in progress. Provided fluorescent kinetics also leads to assessment of the target sequence and no further post-amplification analysis is required. Therefore, turn-around time is reduced and the possibility of contamination with the PCR product is removed.

2. Kit Contents

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

Label	Content	Quantity
F2 Mix	PCR Master mix*	480 µl
MM Pos Ctrl	MM Positive Control	50 µl
MW Pos Ctrl	MW Positive Control	50 µl
WW Neg Ctrl	WW Negative Control	50 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

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

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 tip
- DNA extraction kit
- Nuclease free 1.7ml microtubes and PCR microtubes
- 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 mastermix is aliquoted into tubes and c) Reaction preparation area for addition of extracted sample 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 0.2ml 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 Factor II mutation 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 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 following:

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

9. Internal Control (IC)

Each person carries wild type, mutant or both alleles of F2. These allels serve as both the target and the Internal Control of the assay. Any sample should always be positive for at least one of them. If a sample is negative for both alleles, the reaction is inhibited and the test should be repeated.

10. PCR Protocol

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

cold block. Consider one tube for each sample plus one for each control and one for NTC.

Pipette 20µl of F2 Mix directly to each tube followed by addition of 5µl of isolated DNA.

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

Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.

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

11. Programming Rotor-Gene

- 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, Rotor-Gene 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 Factor II 0.2 RG or Factor II 0.1 RG (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 30 sec*	
	72°C x 15 sec	
3	**95°C x 15 sec**	1
4	**40°C x 10 min**	1
5	**Melt 42°C-75°C ***	1

Fluorescence should be collected at steps marked with star (*) for FAM.
The PCR Mix is ROX free.

12. Data Analysis

Analyze 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 48-49°C) is for wild type allele (W) and the right one (at 58-59°C) is for the mutant allele (M). Analyze the results as follows:

- A sample with only a single pick at 48-49°C is Negative for Factor II G20210A and is considered wild type homozygous (WW).
- A sample with only a single pick at 58-59°C is Positive and homozygous (MM) for Factor II G20210A (both alleles are mutant).
- A sample with two picks at 48-49°C and at 58-59°C is Positive for Factor II G20210A and heterozygous (WM). Such a patient carries both wild type and mutant alleles for Factor II.

Results are inconclusive and the test should be repeated if:

- No pick is detected for a patient at either 48-49°C or 58-59°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 Rotor-Gene manual for further information. Figures 1, 2 and 3 represent sample analysis and the relevant peak for each genotype.

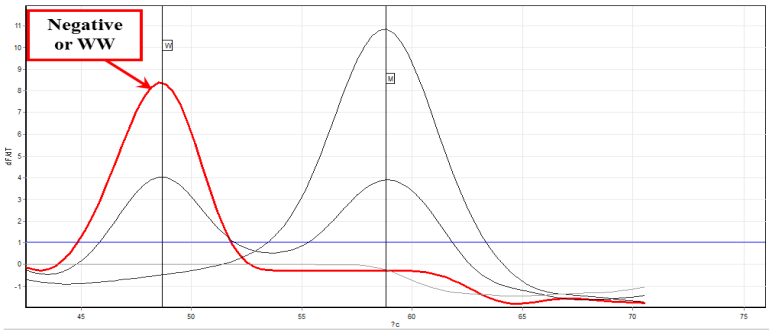


Figure 1: Wild type (WW) graph on Rotor-Gene

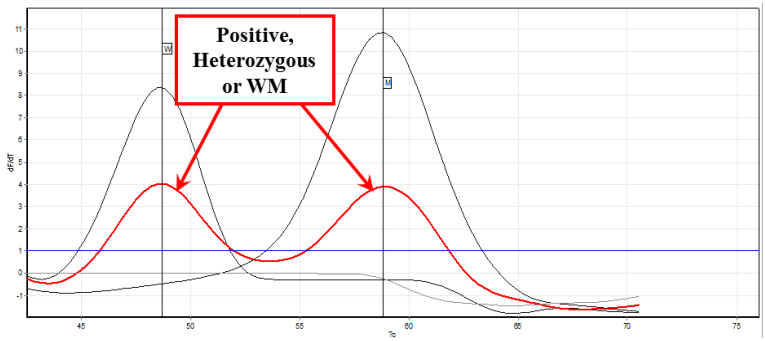


Figure 2: Mutant Heterozygote (WM) graph on Rotor-Gene

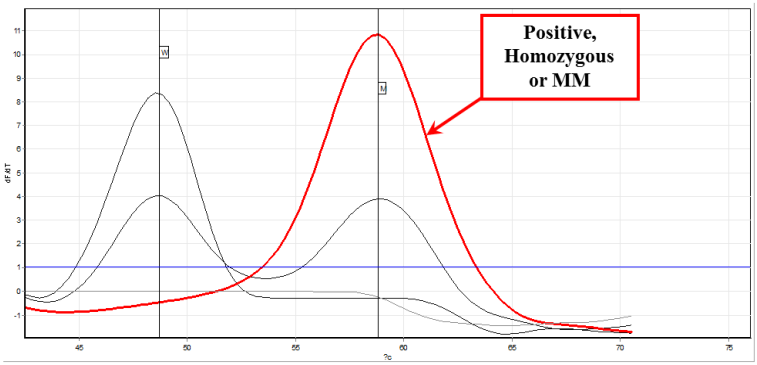


Figure 3: Mutant Homozygote (MM) graph on Rotor-Gene