

راهنمای کیت

MTHFR-1298 RQ

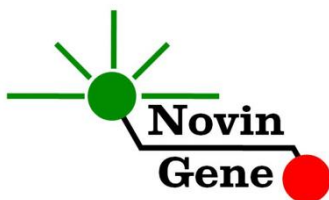
جهت تشخیص جهش MTHFR (A1298C)
به روش Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene یا StepOne
مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-24-100

ویرایش ۱/۰

بهمن ۱۳۹۶



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..... ۵
۹. کنترل داخلی..... ۶
۱۰. دستور کار PCR..... ۶
۱۱. تنظیم دستگاه Rotor-Gene..... ۷
۱۲. تنظیم دستگاه StepOne..... ۷
۱۳. تنظیم سایر دستگاه ها..... ۸
۱۴. آنالیز نتایج Rotor-Gene..... ۸
۱۵. آنالیز نتایج StepOne..... ۱۱

کیت **MTHFR-1298 RQ** جهت تشخیص جایگزینی **MTHFR A1298C** در DNA انسانی می باشد. این کیت مخصوص استفاده تحقیقاتی است و برای دستگاه Rotor-Gene و StepOne طراحی شده است.

۱. مقدمه

MTHFR نام اختصاری آنزیم متیلن تترا هیدروفولات ردوکتاز (Methylenetetrahydrofolate reductase) می باشد که در تنظیم متابولیسم فولات (folate) و هموسیستئین (homocysteine) نقش دارد. جایگزینی C677T در ژن این آنزیم، فعالیت آن را به میزان ۳۰ تا ۶۵٪ کاهش میدهد. جایگزینی A1298C نیز باعث کاهشی حدود ۱۵ تا ۳۰٪ در فعالیت این آنزیم می شود. لذا این جایگزینی ها از مهم ترین عوامل ژنتیکی موثر بر میزان هموسیستئین خون و متابولیسم آن محسوب می شوند و در نتیجه با طیف وسیعی از بیماری ها مرتبط می گردند. از جمله می توان ترومبوز شریانی، تصلب شریانی، بیماری قلبی ناشی از عروق کرونر، نقص لوله عصبی (در دوران جنینی)، انواعی از سرطان، اثرات جانبی برخی داروها و پوکی استخوان را نام برد. البته باید توجه داشت که در موارد فوق اتفاق نظر وجود ندارد و گاهی یافته ها متناقض می باشند. شیوع این جایگزینی در جوامع مختلف متفاوت است و بین ۴٪ تا ۵۰٪ متغیر می باشد.

کیت MTHFR-1298 برای تشخیص جایگزینی A1298C در ژن MTHFR به روش Real-Time PCR طراحی و تولید شده است. در این روش همزمان با انجام PCR، محصول آن با استفاده از پروب های فلورسانت شناسایی می شود. بنابراین پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی نبوده، علاوه بر کاهش زمان کار، از ایجاد آلودگی نیز پیشگیری می شود. این کیت برای استفاده با دستگاه Rotor-Gene یا دستگاه StepOne طراحی شده است.

۲. محتویات کیت

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

حجم	محتوا	برچسب
۴۸۰ میکرولیتر	میکس آماده برای PCR*	MTHFR Mix
۵۰ میکرولیتر	شاهد مثبت هموزیگوت	MTHFR MM
۵۰ میکرولیتر	شاهد مثبت هتروزیگوت	MTHFR WM
۵۰ میکرولیتر	شاهد منفی (هموزیگوت سالم)	MTHFR WW
۲۰۰ میکرولیتر	آب مخصوص PCR	Water

* یک، دو یا چهار تیوب، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت

تمامی مواد کیت که در جدول بالا ذکر شده است 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 مکرر و بیش از سه بار این مواد، به ویژه میکس PCR خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود.

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 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 بین این سه فضا پرهیز کنید.
- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.
- هنگام استفاده مواد کیت را روی یخ خرد شده قرار دهید تا کاملاً 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. از استفاده از یخ های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.

• 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 با این کیت نیم میلی لیتر خون کامل (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 چند روز در دمای چهار درجه سانتیگراد نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود. برای نگهداری نمونه در زمان های طولانی تر، آن را به حجم های کوچک تقسیم نموده و سپس در دمای بیست درجه زیر صفر نگهداری نمود. در چنین شرایطی نمونه تا چند ماه پایدار می ماند.

۷. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می شود و هنگام نمونه گیری نباید از هپارین به عنوان عامل ضد انعقاد استفاده شود. همچنین نمونه بیماران تحت درمان با هپارین نیز برای PCR مناسب نمی باشد. مقادیر بالای بیلی روبین (حداکثر تا ۴/۵ میلی گرم در دسی لیتر) و چربی (حداکثر تا ۱۰۰۰ میلی گرم در دسی لیتر) و نیز همولیز خون برای این آزمایش مزاحمتی ایجاد نمی کند.

۸. استخراج DNA

برای استخراج از روش ها 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)

۹. کنترل داخلی

هر فرد حامل ژن طبیعی یا جهش یافته MTHFR و یا هر دوی آن ها 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.

۱۰. دستور کار PCR

ابتدا تمامی لوله ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا بطور کامل محتویات آن ها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از یکنواخت شدن آن ها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید. تعداد مورد نیاز لوله روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه ها، چهار لوله نیز برای شاهد های مثبت و منفی نیز در نظر بگیرید.

به هر لوله ۲۰ میکرولیتر از **MTHFR Mix** و سپس ۵ میکرولیتر از **DNA**

نمونه و یا شاهد یا آب اضافه کنید و درپوش لوله ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: در صورت استفاده از دستگاه **StepOne** لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: هنگام استفاده از دستگاه **Rotor-Gene**، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

توجه داشته باشید تعیین ژنوتایپ نمونه ها تنها در صورتی ممکن خواهد بود که هر چهار شاهد MM، WM، WW و آب یا شاهد بدون DNA در آزمایش استفاده شده باشند!

۱.۱. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید! دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق وصل کنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود. در لوح فشرده همراه کیت روی فایل "MTHFR 1298 0.1" و یا "MTHFR 1298 0.2" (با توجه به میکروتیوب های استفاده شده) دوبار کلیک کنید تا برنامه باز شود. در منوی بالای صفحه بر روی دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز بر روی دکمه استارت کلیک کنید و فایل را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه روشن شود. در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه یا شاهد را وارد کنید.

۱.۲. تنظیم دستگاه StepOne

لوح فشرده همراه کیت را در کامپیوتر مرتبط به دستگاه قرار دهید. نرم افزار دستگاه را باز کنید (StepOne software 2.*). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل داخل لوح فشرده را انتخاب کنید. از منوی سمت چپ Plate Setup و سپس دکمه Assign Targets and Samples را انتخاب کنید. شاهدهای مثبت و منفی و چند نمونه از پیش تعریف شده اند. شاهدها و تعداد نمونه مورد نظر خود را در ردیف دلخواه کپی کنید. برای این کار از گزینه های کلیک راست (copy, paste, clear) می

توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی Define Targets and Samples می توانید تعداد نمونه های مورد بررسی را اضافه کنید و نام نمونه ها را مطابق نام بیماران تغییر دهید. در پایان تنظیمات دکمه Start Run را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

۱۳. تنظیم سایر دستگاه ها

چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاه های Real-Time PCR استفاده می کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید:

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 10 min	1
2	95°C x 15 sec	50
	57°C x 40 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۵۷ درجه و برای رنگ های FAM و VIC تنظیم شود.

Mix PCR موجود در کیت حاوی ROX می باشند. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می باشد.

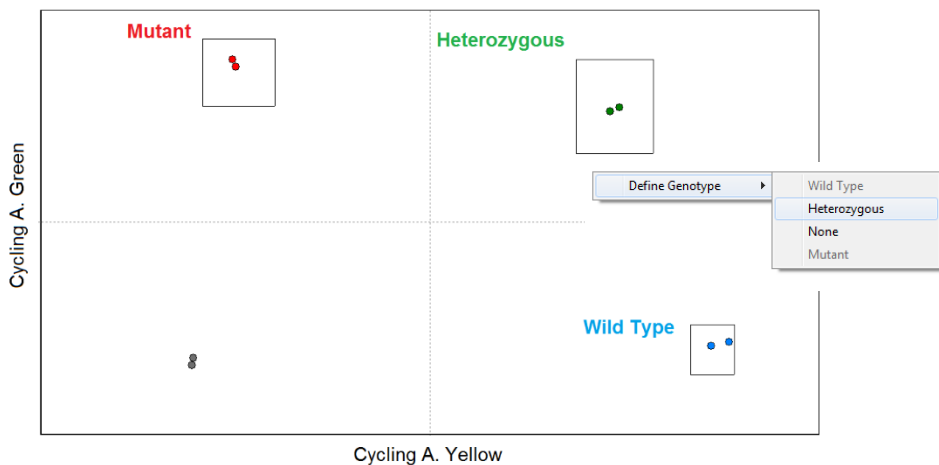
۱۴. آنالیز نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Analysis گزینه other و سپس Scatter Graph Analysis را انتخاب کنید. سپس با استفاده از دکمه Ctrl هر دو کانال Green و Yellow را انتخاب کرده و بر روی گزینه Show کلیک کنید.

توجه داشته باشید که تشخیص ژنوتایپ نمونه ها در صورتی ممکن است که هر

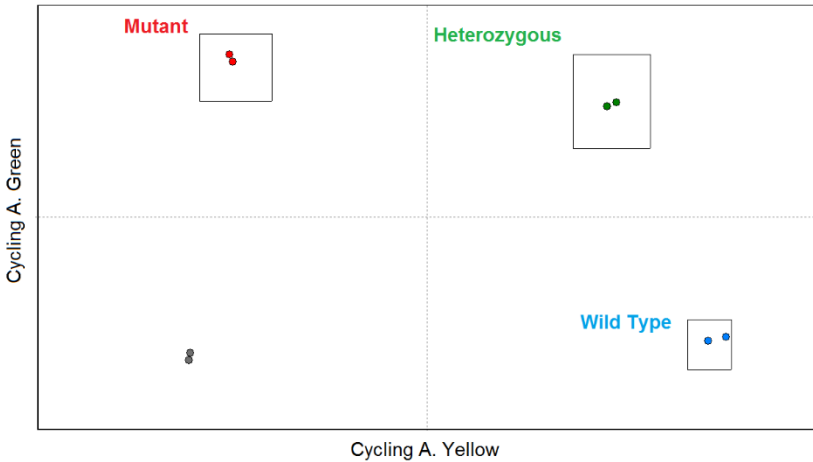
سه شاهد کیت در آزمایش استفاده شده باشند!

در پنجره های آنالیز، در قسمت سمت چپ پایین، نمودار پراکندگی نمونه ها را ملاحظه خواهید کرد؛ هر نقطه معرف یکی از نمونه ها میباشد. محور عمودی میزان فلورسانس سبز و محور افقی میزان فلورسانس زرد را نشان میدهد. توجه داشته باشید که کانال سبز به آلل Mutant یا M و کانال زرد به آلل طبیعی Wild type یا W اختصاص دارد. تابش سبز برای نمونه های هموزیگوت Mutant یا MM چند برابر تابش زرد میباشد و این نمونه ها در ناحیه چپ و بالای نمودار یا شمال غربی تجمع پیدا میکنند. در مقابل، تابش زرد برای نمونه های سالم یا WW چند برابر تابش سبز است و این نمونه ها در سمت راست و پایین نمودار یا جنوب شرقی مشاهده خواهند شد. در نمونه های هتروزیگوت یا WM تابش سبز و زرد تقریباً متناسب بوده و این نمونه ها در سمت راست و بالای نمودار یا شمال شرقی قرار میگیرند. نهایتاً نمونه بدون DNA یا نمونه آب دارای تابش سبز و زرد اندکی بوده و این نمونه ها در ناحیه سمت چپ پایین نمودار یا جنوب غربی دیده میشوند. اکنون برای تعیین ژنوتایپ نمونه ها، نواحی بالا را باید روی نمودار مشخص کنید. به این منظور ابتدا تمامی نمونه ها را خاموش کنید و تنها شاهد های مثبت و منفی را در وضعیت نمایش نگه دارید. سپس همزمان با نگه داشتن کلیک چپ در اطراف هر شاهد یک مستطیل ترسیم کنید. این مستطیل ها بیانگر همان نواحی هستند که در بالا شرح داده شدند. هنگام ترسیم هر یک از آن ها ژنوتایپ شاهد را نیز در گزینه Define Genotype که بر روی صفحه می آید انتخاب کنید (تصویر یک).



تصویر ۱: تعریف ژنوتایپ های شاهد های تست در دستگاه Rotor-Gene

پس از مشخص کردن و تعریف نواحی ذکر شده؛ میتوانید علاوه بر شاهد ها سایر نمونه ها را نیز روشن کنید تا ژنوتایپ هر نمونه بر اساس پراکندگی آن در اطراف هر شاهد و با توجه به موقعیت آن در نواحی بالا نمایش داده شود (تصویر دو).



تصویر ۲: نمایش چگونگی پراکندگی انواع نمونه ها در نمودار Rotor-Gene

راهنما متفاوت باشد؛ یا در صورتی که نواحی ژنوتایپ ها با هم همپوشانی داشته باشند آزمایش باید تکرار شود. همچنین در صورتی که یک نمونه خارج از نواحی تعریف شده بالا قرار بگیرد باید مجدداً آزمایش شود!

۱۵. آنالیز نتایج StepOne

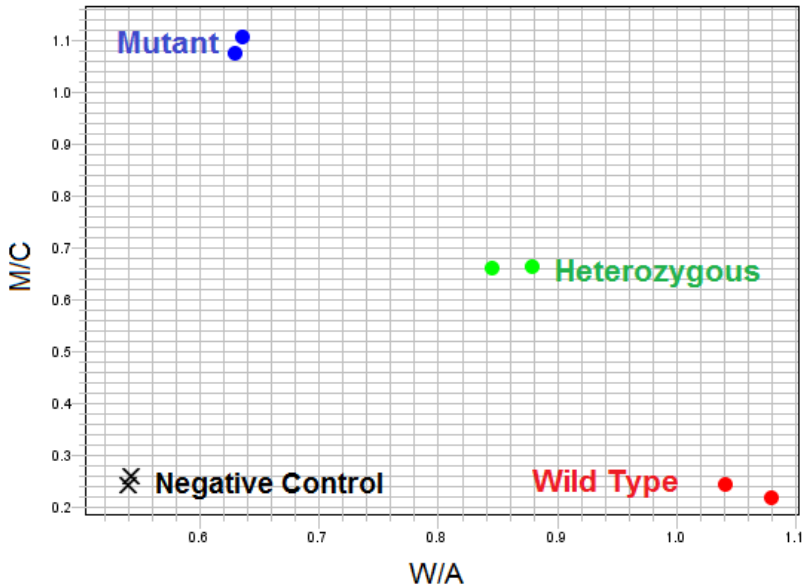
برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه بر روی دکمه Allelic Discrimination Analysis کلیک کرده و سپس گزینه را انتخاب کنید. نرم افزار دستگاه با مقایسه فلورسانس نمونه ها و شاهد ها، ژنوتایپ نمونه ها را تعیین میکند.

توجه داشته باشید که نرم افزار دستگاه تنها در صورتی می تواند ژنوتایپ نمونه ها را تشخیص دهد که هر سه شاهد کیت و آب یا شاهد فاقد DNA در آزمایش استفاده شده باشند!

برای ملاحظه نمودار مورد انتظار شاهد ها به تصویر سه مراجعه کنید. هر نقطه معرف یکی از نمونه ها میباشد
ژنوتایپ شاهد ها و نمونه ها همچنین با رنگ نقاط نیز از هم تفکیک شده اند .
هموزیگوت Mutant یا MM با آبی، هموزیگوت سالم یا WW با قرمز،
هتروزیگوت یا WM با سبز، و نهایتا نمونه شاهد بدون DNA با رنگ سیاه نشان
داده می شوند. ضربدر (×) سیاه نیز نشانگر نمونه ای میباشد که ژنوتایپ آن
قابل شناسایی نبوده است.

در هر نمودار محور عمودی میزان فلورسانس FAM و محور افقی میزان
فلورسانس VIC را نشان می دهد. توجه داشته باشید که کانال FAM به آلل
Mutant یا M و کانال VIC به آلل طبیعی یا W اختصاص دارد. تابش FAM
برای نمونه های هموزیگوت Mutant یا MM چند برابر تابش VIC می باشد و
این نمونه ها در ناحیه چپ و بالای نمودار یا شمال غربی تجمع پیدا می کنند.
در مقابل تابش VIC برای نمونه های سالم یا WW چند برابر تابش FAM است
و این نمونه ها در سمت راست و پایین نمودار یا جنوب شرقی مشاهده خواهند
شد. در نمونه های هتروزیگوت یا WM تابش FAM و VIC تقریبا متناسب بوده
و این نمونه ها در سمت راست و بالای نمودار یا شمال شرقی قرار می گیرند.
نهایتا نمونه بدون DNA یا نمونه آب دارای تابش FAM و VIC اندکی بوده و این
نمونه ها در ناحیه سمت چپ پایین نمودار با جنوب غربی دیده می شوند
(تصویر سه).

Allelic Discrimination Plot



تصویر ۳: نمایش چگونگی پراکندگی انواع نمونه ها در نمودار دستگاه StepOne

توجه! در صورتی که موقعیت شاهد ها در نمودار با آنچه در این راهنما نشان داده شده متفاوت باشد و یا در صورتی که شاهد ها نزدیک به هم و غیر قابل تفکیک باشند آزمایش باید تکرار شود. همچنین در صورتی که نمونه ها با ضربدر (×) سیاه در بین کنترل ها نمایش داده شوند آزمایش باید تکرار شود!

MTHFR-1298 RQ

Kit Manual

**For Real-Time PCR Detection of MTHFR
(A1298C) Variant**

For use with Rotor-Gene or StepOne
Research use only

NG-WI-ASL-24-100
Version 1.0
Feb 2018

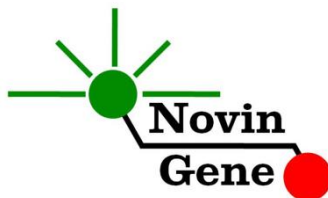


Table of Contents:

1. Introduction.....	2
2. Kit Contents	3
3. Storage and Stability	3
4. General Precautions	3
5. Additionally Required Materials.....	4
6. Specimen, Storage and Transport	4
7. Interfering Substances.....	5
8. DNA Isolation	5
9. Internal Control	5
10. PCR Protocol	5
11. Programming Rotor-Gene.....	6
12. Programming StepOne	6
13. Programming Other Machines	7
14. Data Analysis: Rotor-Gene	7
15. Data Analysis: StepOne	9

MTHFR-1298 RQ kit is intended for detection of MTHFR (A1298C) variant in human DNA. This kit is designed for use with Rotor-Gene or StepOne machines. This kit is for research use only!

1. Introduction

MTHFR stands for Methylenetetrahydrofolate reductase which is a key regulatory enzyme in folate and homocysteine metabolism. Since, the C677T and A1298C variants show reduced activity (30-65% and 15-30% respectively), these polymorphisms are among the most important genetic determinants of plasma total homocysteine. Due to their influence on homocysteine metabolism, they have been linked to several complex disorders including arterial thrombosis, atherosclerosis, coronary heart disease, neural tube defects, several types of cancer, adverse drug interactions and osteoporosis though, findings are still controversial. Depending on the ethnic background up to 50% of population may carry the variant allele of MTHFR.

MTHFR-1298 TM kit provides a ready-to-use Real-Time PCR system for detection of A1298C mutation with Rotor-Gene or StepOne machines. 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 and StepOne templates and following reagents:

Label	Content	Quantity
MTHFR Mix	PCR Mix*	480 µl
MTHFR MM	Homozygous Positive Control	50 µl
MTHFR WM	Heterozygous Positive Control	50 µl
MTHFR 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

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiry date mentioned. Avoid repeated freeze-thaws especially for PCR Mix more than few times to prevent reduced sensitivity.

4. 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 master-mix is aliquoted into tubes and c) Reaction preparation area for addition of templates 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**.
- Keep PCR Mix tube at -20°C at all times. Take it out just before use and return it to freezer immediately after.
- Do not place 0.2ml PCR tubes on crushed ice. Use cold blocks instead.

5. 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 pipettors and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease free 1.7ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

6. Specimen, Storage and Transport

Whole blood (0.5ml) is the preferred sample. Peripheral blood should be collected in sterile condition in proper and sterile tubes. We recommend EDTA or Citrate as anticoagulant. Whole blood should be shipped and stored at $+4^{\circ}\text{C}$ (stable for few days). For longer terms, sample should be aliquoted and stored at -20°C which is stable for few months.

7. Interfering Substances

Heparin (more than 10 IU/ml) affects the PCR. Blood collected in heparin containing tubes should not be used. Samples of heparinised 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

Each sample carries wild type, mutant or both alleles of MTHFR. These alleles 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 a 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 the NTC.

Pipette 20ul of [MTHFR Mix](#) directly to each tube followed by adding 5ul of [controls](#) or [sample DNA](#).

Cap the tubes and visually inspect to make sure all are capped 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.

Please note that genotype of the samples can be called only if all the four controls provided with kit are used in each test!

11. Programming Rotor-Gene

- Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring on the rotor!

Open the CD provided in the kit and double click on “MTHFR 1298 0.1” or on “MTHFR 1298 0.2” (according to the microtubes used) to open the program. Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop up window, click start again and save the run file. Edit sample names.

12. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the “Set Up” menu click on “Template” and select the file on CD provided with the kit. Click on “Plate Setup”. Controls and few samples are defined. You may change plate set up using right click options (copy, past, clear). You may also add or remove samples on “Define Targets and Samples” menu. When finished, click on “Start Run” and save the experiment on desired location. Instrument will start shortly.

13. Programming Other Machines

If you apply this kit to other Real-Time PCR machines, program it according to the following table:

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 10 min	1
2	95°C x 15 sec	50
	57°C x 40 sec	

Fluorescence should be collected at 57°C for FAM and VIC dyes. PCR Mix contains ROX with the final concentration of 300nM in the reaction.

14. Data Analysis: Rotor-Gene

Analyze data according to manufacturer recommendations. Briefly, click on analysis menu select “Other” and then “Scatter Graph Analysis”. Using Ctrl button, mark both Green and Yellow channels and then click on “Show”.

The “Scatter Graph Window” is now shown in the lower left window. Each dot represents one sample. The vertical axis shows the Green fluorescence and horizontal axis is for the Yellow fluorescence. Note that M allele is detected in Green channel and W allele in Yellow channel.

Therefore, samples are located in four regions of the graph. MM samples with high Green and low Yellow fluorescence gather in upper left; WW samples with low Green fluorescence and high Yellow gather in lower right; WM samples with high Green and high Yellow fluorescence gather in upper right; and finally NTC or control with no DNA gather in lower left with low Green and low Yellow fluorescence.

In order to determine genotypes of the samples, above regions should be defined on the graph. To do so, turn off all the samples except for the negative and positive controls. Then drag a rectangle around each control. Each rectangle represents one of the above mentioned regions. Label MM genotype region as “Mutant”, WM as “Heterozygous”, WW as “Wild Type” and Negative Control as “None” (Figure 1).

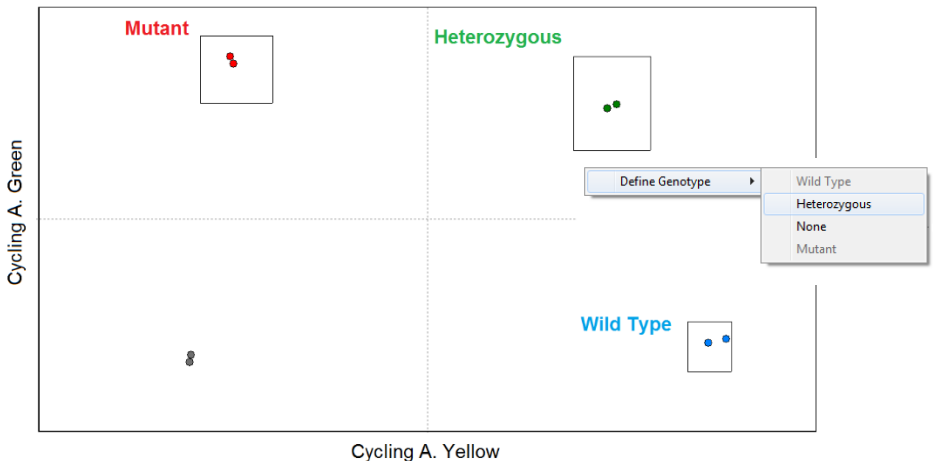


Figure 1: Defining genotypes of different controls of the test on Rotor-Gene instrument.

Now turn on all the samples and the results are displayed in the tab “Scatter Analysis Results” (Figure 2).

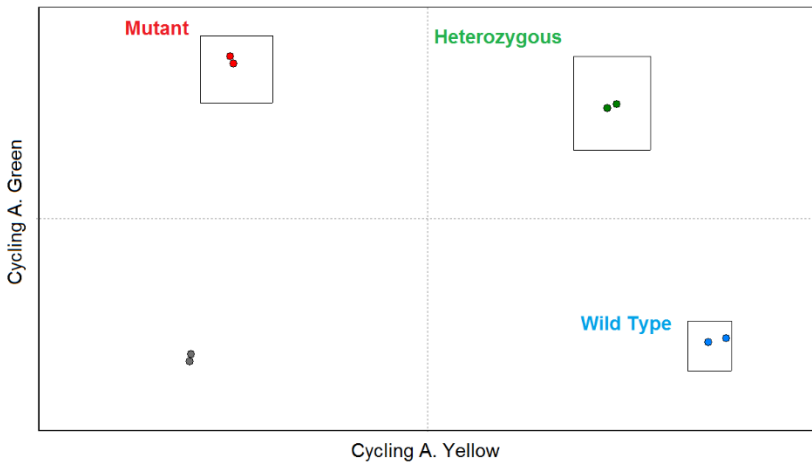


Figure 2: Typical scatter graph for controls and samples on Rotor-Gene instrument.

Note! If location of controls are not similar to the typical graph represented here; or if any of above regions overlap in a graph, results are not valid and test should be repeated. Also if a sample is located in between regions, it should be re-examined!

15. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to manufacturer recommendations. Briefly, click on Analyze and select “Allelic Discrimination” tab. Genotype of the samples are automatically determined by the software based on comparison of their fluorescence with the controls. Figure 3 represents the typical graph. Each dot represents one sample. All samples are color coded based on their genotype as blue for MM, Red for WW, Green for WM, and

Black box for control with no DNA or NTC. Unknown samples will be marked with black "×".

Note that the vertical axis shows the FAM fluorescence and horizontal axis is for the VIC fluorescence. Accordingly, M allele is detected in FAM channel and W allele in VIC channel. Therefore, samples are located in four regions of the graph. MM samples with high FAM and low VIC fluorescence gather in upper left; WW samples with low FAM fluorescence and high VIC gather in lower right; MW samples with high FAM and high VIC fluorescence gather in upper right; and finally NTC or control with no DNA gather in lower left with low FAM and low VIC fluorescence. Genotypes of samples are automatically determined by the software based on comparison with the controls (Figure 3).

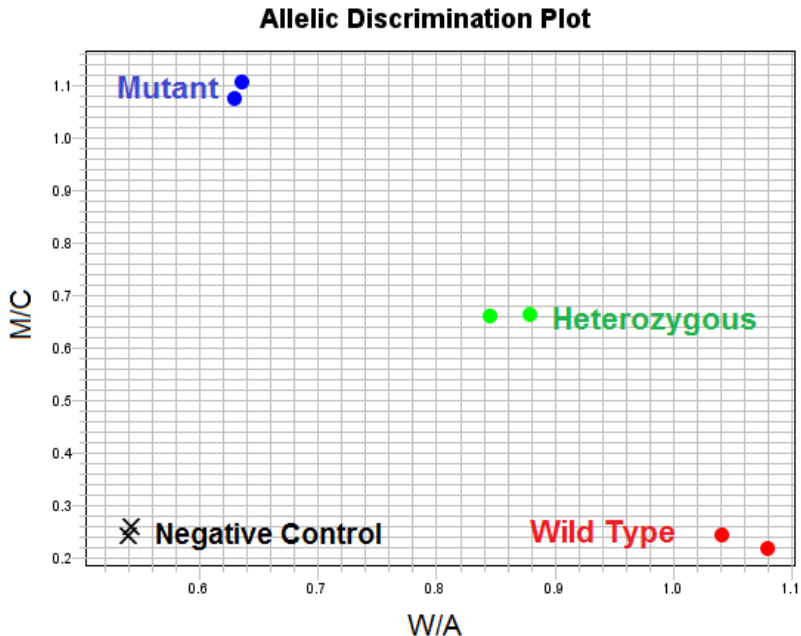


Figure 3: Typical graph for controls and samples on StepOne instrument.

Note! If location of controls are not similar to the typical graph represented here; or if controls are located too close to each other in a graph; and if samples lie in between controls and genotypes cannot be called, results are invalid and test should be repeated!