

راهنمای کیت فاکتور ۲ (Factor II RQ Kit)

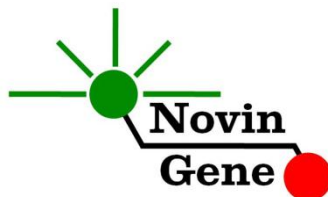
جهت تشخیص جهش (G20210A) Factor II
به روش Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene یا StepOne
مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-16-200

ویرایش ۲/۱

دی ۱۳۹۸



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 دستگاهها.....	۸
۱۴. آنالیز نتایج Rotor-Gene.....	۸
۱۵. آنالیز نتایج StepOne.....	۱۱

کیت **Factor II RQ** جهت تشخیص جهش مربوط به پروترومبین یا فاکتور ۲ (G20210A) در DNA انسانی می باشد. این کیت مخصوص استفاده تحقیقاتی استو برای دستگاه های Rotor-Gene و StepOne طراحی شده 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 ترومبوز وریدی ((venous thromboembolism (VTE) می باشد. این جهش خطر وقوع ترومبوز 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 توالی ژن پروترومبین ممکن است.

کیت تشخیص فاکتور ۲ برای تشخیص جهش G20210A 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:

برچسب	محتوا	حجم
F2 RQ Mix	میکس آماده برای * PCR	۴۸۰ میکرولیتر
F2 MM Ctrl	شاهد مثبت هموزیگوت	۵۰ میکرولیتر
F2 WM Ctrl	شاهد مثبت هتروزیگوت	۵۰ میکرولیتر
F2 WW Ctrl	شاهد منفی (هموزیگوت سالم)	۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

* 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 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 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 نگه دارید 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 یخهای 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، ۰/۵ 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 چندروز 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 بیستدرجه 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. کنترل داخلی

هر فرد حامل ژن طبیعی یا جهش یافته فاکتور ۲ و یا هر دوی 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 آلتها خود به عنوان کنترل داخلی این آزمایش عمل میکنند. 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 از روشها و کیت‌های مختلفی می‌توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت‌های زیر را توصیه می‌کنیم:

- 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. دستور کار PCR

ابتدا تمامی لوله‌ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا بطور کامل محتویات آن‌ها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن آن‌ها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آن‌ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید. تعداد مورد نیاز لوله‌های بلوک آلومینیوم سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه‌ها، چهار لوله نیز برای شاهد‌های مثبت و منفی نیز در نظر بگیرید.

به هر لوله ۲۰ میکرولیتر از **F2 RQ Mix** و سپس ۵ میکرولیتر از

DNA نمونه و یا شاهد یا آب اضافه کنید و درپوش لوله‌ها را ببندید. سپس آن‌ها را مطابق شماره‌ها داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: در صورت استفاده از دستگاه **StepOne** لوله‌ها 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 نمونه‌ها تنها در صورتی ممکن خواهد بود که هر چهار شاهد **MM**، **WM**، **WW** و آب یا شاهد بدون **DNA** در آزمایش

استفاده شده باشند.

۱۱. 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 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 0.2 و یا F2 0.1 (با توجه به میکروتیوب 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.

۱۲. 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	45
	58°C x 40 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۵۸ درجه و برای رنگ های FAM و VIC تنظیم شود.
PCR Mix 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.

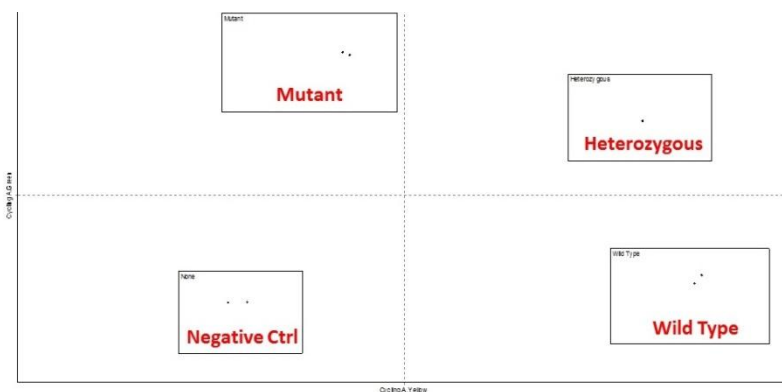
توجه داشته باشید که تشخیص ژنوتایپ نمونه ها در صورتی ممکن است که هر سه شاهد کیت در آزمایش استفاده شده باشند.

در پنجره های آنالیز، در قسمت سمت چپ پایین، نمودار پراکندگی نمونه ها را ملاحظه خواهید کرد؛ هر نقطه معرف یکی از نمونه ها می باشد. 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 شاهدهای 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 آنها ژنوتایپ شاهد را نیز در گزینه **Define Genotype** که بر روی صفحه می آید انتخاب کنید (تصویر یک). پس از مشخص کردن و تعریف نواحی ذکر شده؛ 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 ۱: تعریف ژنوتایپ های شاهد های تست در دستگاه Rotor-Gene



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

توجه! در صورتی که موقعیت شاهد ها در نمودار با نمودار نمونه در این راهنما متفاوت باشد؛ یا در صورتیکه نواحی ژنوتایپها با هم هم پوشانی

داشته باشند آزمایش باید تکرار شود. همچنین در صورتیکه یک نمونه خارج از نواحی تعریف شده بالا قرار بگیرد آزمایش باید تکرار شود!

۱۵. آنالیز نتایج StepOne

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

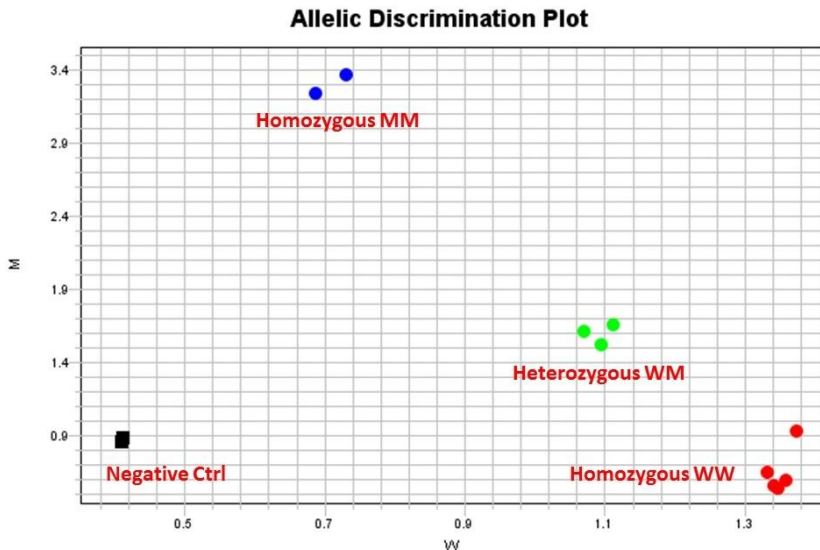
توجه داشته باشید که نرم افزار دستگاه تنها در صورتی می تواند ژنوتایپ نمونه ها را تشخیص دهد که هر سه شاهد کیت و آب یا شاهد فاقد DNA در آزمایش استفاده شده باشند!

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 میشوند . ضربدر (x) 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 میدهد. 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 میباشد و این نمونه ها در ناحیه چپ و بالای نمودار یا شمال غربی تجمع پیدا میکنند. 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 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 FAM و VIC اندکی بوده و این نمونه ها در ناحیه سمت چپ پایین نمودار با جنوب غربی دیده میشوند (تصویر سه).



تصویر ۳: نمایش چگونگی پراکندگی انواع نمونه ها در نمودار دستگاه StepOne
توجه! در صورتیکه موقعیت شاهد ها در نمودار با آنچه در این راهنما نشان داده شده متفاوت باشد و یا در صورتیکه شاهد ها نزدیک به هم و غیر قابل تفکیک باشند آزمایش باید تکرار شود. همچنین در صورتیکه نمونه ها با ضربدر (×) سیاه در بین کنترل ها نمایش داده شوند آزمایش باید تکرار شود!

Factor II RQ Kit

Manual

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

For use with Rotor-Gene or StepOne
Research use only

NG-WI-ASL-16-200
Version 2.1
December 2019



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

Factor II RQ kit is intended for detection of prothrombin G20210A (Factor II) mutation in human DNA. This kit is designed for use with Rotor-Gene or StepOne machines. This kit is 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.

Factor II TM kit provides a ready-to-use Real-Time PCR system for detection of prothrombin G20210A 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
F2 RQ Mix	PCR Mix*	480 µl
F2 MM Ctrl	Homozygous Positive Control	50 µl
F2 WM Ctrl	Heterozygous Positive Control	50 µl
F2 WW Ctrl	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 PCR 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 PCRMix 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°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 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. Internal Control

Since each person carries wild type, mutant or both alleles, it serves as both the target and the Internal Control for the assay. Any sample should always be positive for at least one of them. If a sample is negative for both alleles, then the test should be repeated.

9. 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).

10. PCR Protocol

Thaw the reagents on crushed ice completely followed by a brief mixing and a quick spin. Place required number of microtubes on cold block. Consider one tube for each sample plus one for each

control and one for the NTC.

Pipette 20µl of F2 RQ 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 "F2 0.1" or on "F2 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	45
	58°C x 40 sec	

Fluorescence should be collected at 58°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).

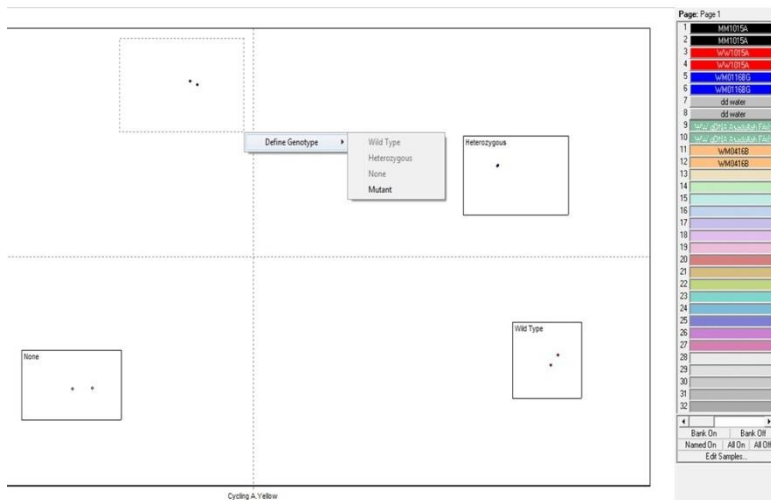


Figure 1: Defining genotypes of different controls of the test on Rotor-Gene instrument.

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

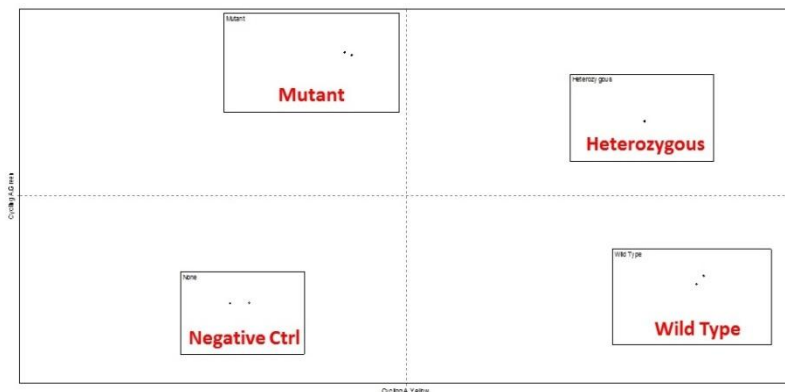


Figure 2: Typical scatter graph for controls and samples in Rotor-Gene instrument.

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 “X”. 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

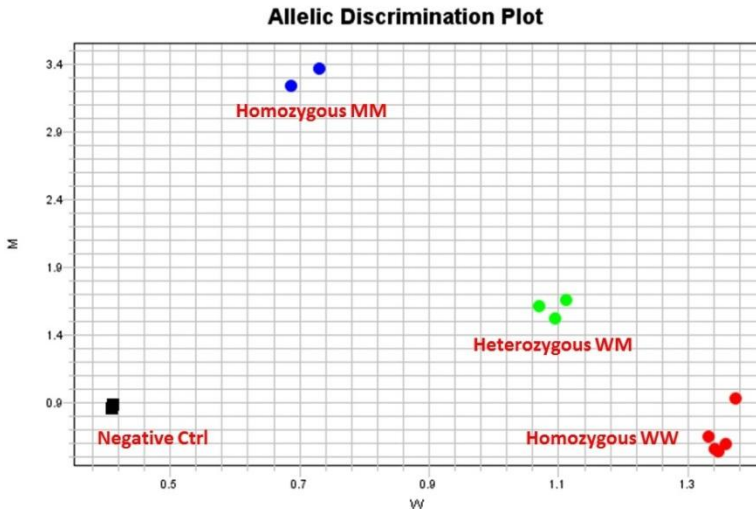


Figure 3: Typical graph for controls and samples on StepOne.

. 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; WM 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.

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!

