راهنمای کیت فاکتور 13
(Factor XIII RQ Kit)

جهت تشخیص جهش Factor XIII (Val34Leu)
به روش Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene یا StepOne
مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-19-110
ویرایش 1/1
اسفند 1397

Novin Gene

فهرست مندرجات

1. مقدمه..... 2

2. محتویات کیت..... 3

3. شرایط نگهداری و پایداری کیت..... 3

4. سایر موارد مورد نیاز..... 4

5. نکات قابل توجه..... 4

6. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن..... 5

7. عوامل مزاحم..... 5

8. استخراج DNA..... 6

9. کنترل داخلی..... 6

10. دستور کار PCR..... 7

11. تنظیم دستگاه Rotor-Gene..... 7

12. تنظیم دستگاه StepOne..... 8

13. تنظیم سایر دستگاهها..... 8

14. آنالیز نتایج Rotor-Gene..... 9

15.آنالیز نتایج StepOne..... 11

کیت Factor XIII RQ جهت تشخیص پلی مورفیزم Val34Leu مربوط به فاکتور 13 انعقادی در DNA استخراج شده از سلولهای انسانی می باشد. این کیت مخصوص استفاده تحقیقاتی است و برای دستگاه Rotor-Gene 6000/Q و StepOne طراحی شده است.

1. مقدمه

فاکتور 13 انعقاد خون (Factor XIII)، که سابقا فاکتور پایدار کننده ی فیبرین نامیده می شد، در سال 1948 کشف گردید. این فاکتور با فعالیت آنزیمی خود نقش اساسی در هموستاز خون داشته و سبب استحکام لخته فیبرین و جلوگیری از حذف آن توسط مکانیسم های فیبرینولیتیک شده و کمبود آن موجب افزایش احتمال خونریزی می شود. فاکتور 13، علاوه بر هموستاز، در رگزایی (Angiogenesis)، ترمیم زخم و حفظ بارداری نیز نقش اساسی ایفاء می کند.

پلی مورفیسم های متعددی برای این آنزیم شناخته شده اند که در بین آنها جایگزینی Val34Leu از اهمیت بیشتری برخوردار است. این جایگزینی با افزایش فعالیت این آنزیم منجر به افزایش پایداری لخته فیبرینی می شود. مطالعات بالینی نشان داده اند که این پلی مورفیزم خطر سکته قلبی ، سکته مغزی، و تشکیل لخته های سیاهرگی (deep venous thrombosis) را کاهش داده و از سوی دیگر خطر امبولی ریوی و خونریزی مغزی (intracerebral) را افزایش می دهد. شیوع این پلی مورفیزم در سفید پوستان بیش از سایر نژادها بوده و به 25٪ هم می رسد. با توجه به نقش و اهمیت این جایگزینی در بیماریهای مختلف، مطالعه و بررسی آن می تواند در تعیین روند درمان و تجویز دارو به پزشک معالج کمک به سزایی نماید.

کیت حاضر برای تشخیص جایگزینی Val34Leu در فاکتور 13 انعقادی به روش Real-Time PCR طراحی و تولید شده است. در این روش همزمان با انجام PCR، محصول آن با استفاده از پروب هایی که با رنگ فلورسانت نشاندار شده اند شناسایی می شود بدون این که پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. بنابراین امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت. این کیت برای استفاده با دستگاه Rotor-Gene 6000/Q یا دستگاه StepOne طراحی شده است.

2. محتویات کیت

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

برچسب	محتوا	حجم
F13Q MIX	میکس آماده برای * PCR	500 میکرولیتر
F13 MM Ctrl	شاهد مثبت هموزیگوت	100 میکرولیتر
F13 WM Ctrl	شاهد مثبت هتروزیگوت	100 میکرولیتر
F13 WW Ctrl	شاهد منفی(هموزیگوت سالم)	100 میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	200 میکرولیتر

* یک، دو یا چهار تیوب،به ترتیب برای کیت های 24، 48 و 96 واکنشی

3. شرایط نگهداری و پایداری کیت

تمامی مواد کیت که در جدول بالا ذکر شده است باید در دمای 20 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 مکرّر و بیش از سه بار این مواد، به ویژه میکس PCR خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود.

4. سایر موارد مورد نیاز

- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
- سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب
- ورتکس
- سمپلر متغیر
- کیت استخراج DNA
- تیوب یا استریپ مخصوص Real-Time PCR
- سر سمپلر بدون نوکلئاز و فیلتر دار
- دستکش لاتکس بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

5. 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 تقسیم مواد داخل 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 70 درجه تمیز کنید.

- پیش از باز کردن درپوش لوله های درون کیت، آنها را کاملاً ذوب نموده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آنها را در دور پایین اسپین (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.

6. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش با این کیت، 0/5 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.

7. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از 10 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 4/5 میلی گرم در دسی لیتر) و چربی (حداکثر تا 1000 میلی گرم در دسی لیتر) و نیز همولیز خون برای این آزمایش مزاحمتی ایجاد نمی کند.

8. استخراج DNA

برای استخراج از روشها و کیتهای مختلفی می توان استفاده نمود. ما استفاده از کیتهای 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)

9. کنترل داخلی

این کیت نیازی به استفاده از کنترل داخلی ندارد زیرا هر فرد حامل ژن طبیعی یا جهش یافته فاکتور IIIX 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 آللها 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.

10. 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 مخلوط شدن مواد داخل آن ها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین اسپین کنید.

تعداد مورد نیازی لوله روی بلوک سرد آلومینیومی بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه ها، چهار لوله نیز برای شاهد های مثبت و منفی در نظر بگیرید.

به هرلوله 20 میکرولیتر از F13Q MIX و سپس 5 میکرولیتر از DNA نمونه و یا شاهد یا آب اضافه کنید. درپوش لوله ها را بسته و شماره گذاری کنید.

در صورت استفاده از دستگاه StepOne لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی اسپین کنید. سپس لوله ها را مطابق شماره ها روی روتور Rotor-Gene یا داخل بلوک StepOne قرار دهید.

11. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

دستگاهRotor-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 F13 0.2 (در صورت استفاده از لوله های 0/2 میلی لیتری) و یا F13 0.1 (در صورت استفاده از لوله های 0/1 میلی لیتری) 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.

12. 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.

13. 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 cycle
2	**95°C x 15 sec**	40 cycles
	60°C x 60 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای 60 درجه و برای رنگ های FAM و VIC تنظیم شود.

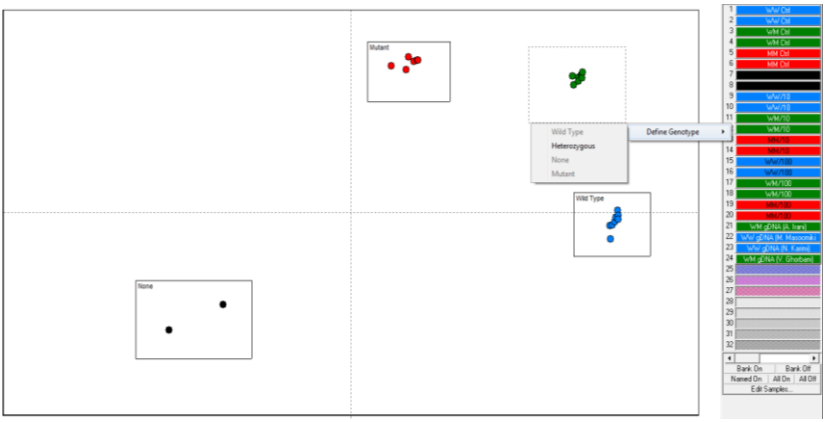
Mix PCR موجود در کیت حاوی ROX می باشند. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می باشد.

14. 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 و آب یا شاهد بدون DNA 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 (Leu 34) یا M و کانال زرد به آلل طبیعی Wild type (Val 34) یا W اختصاص دارد.



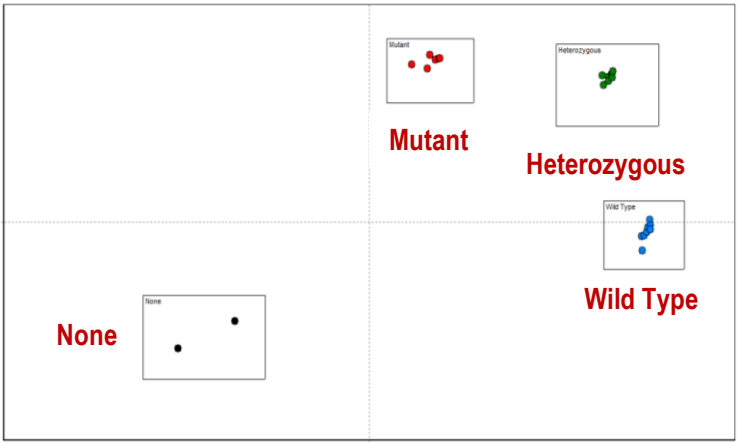
تصویر 1: تعریف ژنوتایپ های شاهدهای تست در دستگاه Rotor-Gene

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 تقریبا متناسب بوده و این نمونه ها در سمت راست و بالای نمودار یا شمال شرقی قرار میگیرند. نهایتا 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؛ 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 2: نمایش چگونگی پراکندگی انواع نمونه ها در نمودار Rotor-Gene

توجه! در صورتی که موقعیت شاهدها در نمودار با نمودار نمونه در این راهنما متفاوت باشد؛ یا در صورتیکه نواحی ژنوتایپها با هم همپوشانی داشته باشند آزمایش باید تکرار شود. همچنین در صورتیکه یک نمونه خارج از نواحی تعریف شده بالا قرار بگیرد باید مجدداً آزمایش شود.

15. 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.

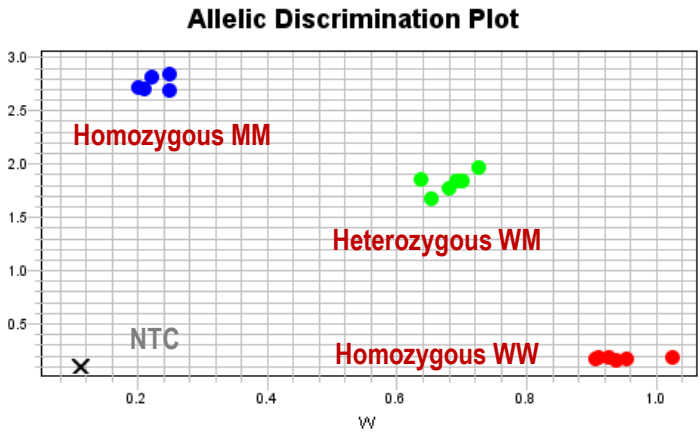
توجه داشته باشید که نرم افزار دستگاه تنها در صورتی می تواند ژنوتایپ نمونه ها را تشخیص دهد که هر سه شاهد کیت و آب یا شاهد بدون DNAدر آزمایش استفاده شده باشند.

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،هتروزیگوتیا WM با سبز، و نهایتا نمونه شاهد بدون DNA با رنگ سیاه نشان داده میشوند . 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 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 تقریبا متناسب بوده و این نمونه ها در سمت راست و بالای نمودار یا شمال شرقی قرار میگیرند.

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 میشوند (تصویر سه).



تصویر 3: 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 شاهدها 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 XIII RQ Kit Manual

For Real-Time PCR Detection of Factor XIII (Val34Leu)

For use with Rotor-Gene or StepOne
Research use only

NG-WI-ASL-19-110
Version 1.1
March 2019

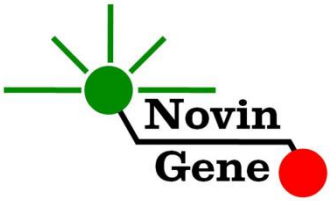


Table of Contents:

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 RotorGene 6
12. Programming StepOne 6
13. Programming Other Machines.....7
14. Data Analysis: RotorGene 7
15. Data Analysis: StepOne 9

Factor XIII RQ kit is intended for the detection of Val34Leu polymorphism of Factor XIII in genomic DNA extracted from human cells. This kit is designed for use with RotorGene 6000/Q or StepOne/StepOnePlus instrument. This kit is for research use only!

1. Introduction

Factor XIII, first called fibrin stabilizing factor, was discovered in 1948. It is involved in the last stage of coagulation and participates in clot preservation. It also participates in wound repair and healing, maintaining pregnancy and acts as proangiogenesis. Among the few polymorphisms known for this factor, the Val34Leu has been studied more extensively as increases the activity of this factor and leads to change in fibrin clots. Studies have shown that this polymorphism may reduce the risk of myocardial infarction, brain infarction and venous thromboembolism (VTE). However, it also increases the risk of intracerebral hemorrhage and pulmonary embolism.

Factor XIII RQ kit provides a ready-to-use Real-Time PCR system for detection of Val34Leu polymorphism of Factor XIII with RotorGene 6000/Q or StepOne/StepOnePlus instrument. This method applies fluorescent dye labeled probes allowing detection of amplified product. Analysis of fluorescent kinetics also leads to assessment of the target sequence in the reaction without requiring post-amplification analysis, reducing the possibility of contamination with the PCR product.

2. Kit Contents

The kit contains a manual, a CD with RotorGene and StepOne templates and following reagents:

Label	Content	Quantity
F13Q Mix	PCR Mix*	500 µl
F13 MM Ctrl	Homozygous Positive Control	100 µl
F13 WM Ctrl	Heterozygous Positive Control	100 µl
F13 WW Ctrl	Negative Control	100 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

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

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 completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice after.
- Keep PCRMix 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 cooling blocks instead.

5. Additionally Required Materials

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Table top microtube centrifuge
- Vortex mixer
- Adjustable pipetters
- DNA extraction kit
- Nuclease free filtered tips
- Tubes or strips and strip caps
- 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 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

This kit requires no internal control since each person carries either wild type or mutant or both alleles. Therefore, any sample is always positive for at least one of them. If a sample is negative for both alleles, then the test should be repeated.

10. PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely followed by a brief mixing and a quick spin. Place required number of tubes on cooled PCR block. Consider one tube for each sample plus one for each control and one for the NTC.

Pipette 20ul of F13Q Mix directly to each tube followed by adding 5ul of controls or isolated DNA.

Cap the tubes/Strips and visually inspect to make sure all are caped securely. If using StepOne/StepOnePlus instrument, spin tubes/strips briefly. Place tubes in the machine. When using RotorGene attach the locking ring.

11. Programming RotorGene

- 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 F13 0.2 (if 0.2ml tubes are used) or on F13 0.1 (if 0.1ml tubes are 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**	40
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM and VIC dyes. PCR Mix contains ROX with the final concentration of 300nM in the reaction.

14. Data Analysis: RotorGene

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 (Leu 34) is detected in Green channel and W (Val34) 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).

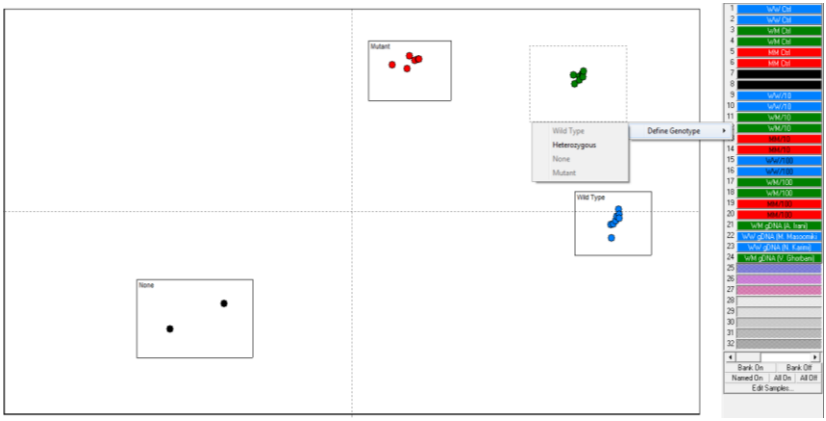


Figure 1: Defining genotypes of different controls of the test on Rotor-Gene instrument.

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

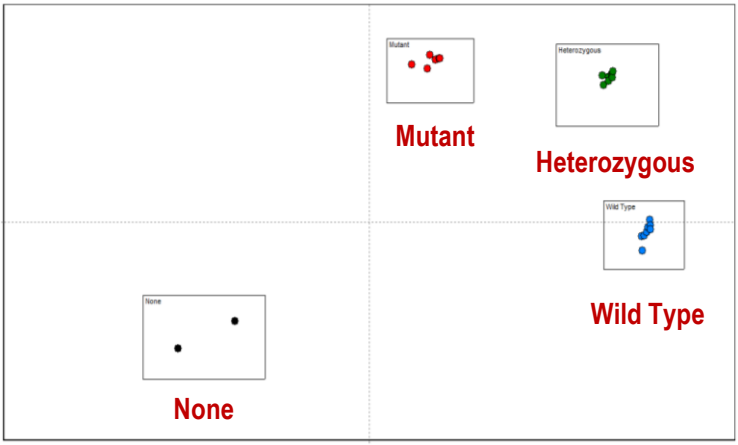


Figure 2: Typical scatter graph for controls and samples on Rotor-Gene instrument.

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 thatthe 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; 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 (Figure 3).

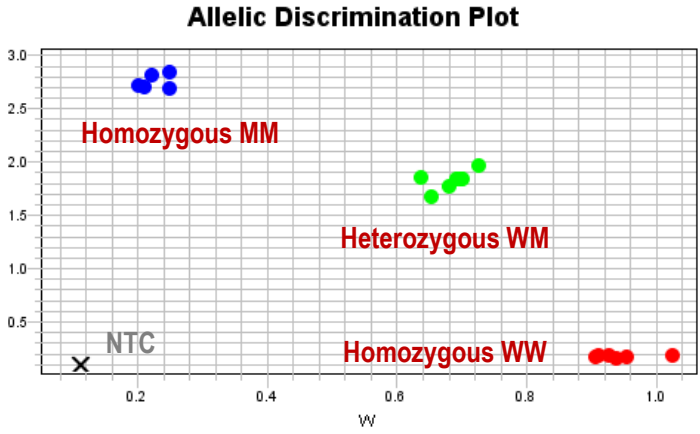


Figure 3: Typical graph for controls and samples on StepOne instrument.

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.