# راهنمای کیت فاکتور ۲
# (Factor II RQ Kit)

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۳/۱

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

Σ 24 (Cat# F2RQ24)
Σ 48 (Cat# F2RQ48)
Σ 96 (Cat# F2RQ96)
NG-WI-ASL-16-301

RUO

**شرکت نوین ژن پارس ویرا**
تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶

Novin Gene

# فهرست مندرجات:


۱. مقدمه ..... ۳
۲. حیطه کاربرد ..... ۳
۳. اطلاعات زمینه ای ..... ۳
۴. اساس آزمایش ..... ۳
۵. محتویات کیت ..... ۴
۶. مدل های بسته بندی ..... ۴
۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت ..... ۵
۸. محدودیت کاربرد ..... ۵
۹. سایر موارد مورد نیاز ..... ۵
۱۰. احتیاط و نکات لازم ..... ۶
۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن ..... ۷
۱۲. عوامل مزاحم ..... ۷
۱۳. کنترل داخلی ..... ۷
۱۴. استخراج DNA ..... ۸
۱۵. دستورکار PCR و مراحل آزمایش ..... ۸
۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها ..... ۹
۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene ..... ۹
۱۸. تنظیم دستگاه StepOne ..... ۱۰

۱۹. تنظیم سایر دستگاه ها ..... ۱۱
۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene ..... ۱۱
۲۱. آنالیز نتایج StepOne ..... ۱۴
۲۲. روش امحاء ..... ۱۶
۲۳. پشتیبانی فنی ..... ۱۷
۲۴. اطلاعات تماس ..... ۱۷
۲۵. منابع. ..... ۱۷
۲۶. توضیحات برچسب ..... ۱۸.

## ۱. مقدمه

کیت Factor II RQ جهت تشخیص جهش G20210A در ژن پروترومبین به روش Real-Time PCR طراحی شده است. در این روش، توالی مورد نظر در نمونه DNA بیمار به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می‌شود. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی کاربرد دارد.

## ۲. حیطه کاربرد

کیت Factor II RQ امکان تشخیص جهش مربوط به پروترومبین یا فاکتور ۲ (G20210A) در DNA انسانی را به روش Real-time PCR فراهم می‌کند. این کیت برای استفاده با دستگاه‌های Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

## ۳. اطلاعات زمینه ای

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)) می‌باشد. این جهش خطر وقوع ترومبوز را دو تا هفت برابر افزایش می‌دهد. همچنین باعث افزایش احتمال سقط جنین نیز می‌شود. میزان شیوع این جهش در جوامع مختلف، متفاوت و بین نیم تا پنج درصد متغیر می‌باشد. تشخیص این جهش تنها از طریق بررسی توالی ژن پروترومبین ممکن است.

## ۴. اساس آزمایش

در این کیت، شناسایی توالی ژنتیکی با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز Polymerase Chain Reaction/PCR انجام می‌شود. طی این واکنش

ماده ژنتیکی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناسایی و تکثیر می‌شود. در روش Real-Time PCR توالی تکثیر شده با استفاده از پروب‌های فلورسنت قابل تشخیص می‌گردد. بنابراین، با بررسی میزان فلورسنت در طی واکنش می‌توان وجود توالی مورد نظر را در نمونه تشخیص داد، بدون آنکه پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به اینکه در این روش نیازی به بررسی محصول واکنش با روش‌هایی مشابه الکتروفورز وجود ندارد، امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

## ۵. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک فلش کارت و مواد زیر می باشد:

| برچسب | محتوا | حجم |
|---|---|---|
| F2 RQ Mix | میکس آماده برای PCR * | ۴۸۰ میکرولیتر |
| Thrmb MM Ctrl | شاهد مثبت هموزیگوت | ۱۰۰ میکرولیتر |
| Thrmb WM Ctrl | شاهد مثبت هتروزیگوت | ۱۰۰ میکرولیتر |
| Thrmb WW Ctrl | شاهد منفی (هموزیگوت سالم) | ۱۰۰ میکرولیتر |
| Water | آب مخصوص PCR | ۲۰۰ میکرولیتر |

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

## ۶. مدل های بسته بندی

کیت در قالب های بیست وچهار، چهل و هشت، و نود و شش واکنش بیست و پنج میکرولیتری در دسترس می باشد.

## ۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰- درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند.

از ذوب و انجماد مکرر محتویات کیت بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود.

همچنین برای حمل و نقل کیت از یخ خشک استفاده نمایید.

## ۸. محدودیت کاربرد

- این کیت تنها برای استفاده توسط کاربران حرفه ای و آموزش دیده طراحی شده است.
- تمامی مراحل کار بایستی مطابق دفترچه راهنمای کامل کیت انجام شود و هرگونه تغییری در آن منجر به بروز خطا در نتایج می‌گردد.
- از محتویات کیت نباید پس از گذشت تاریخ انقضای درج شده روی کیت استفاده شود.
- در صورت تغییر رنگ لیبل حرارتی (به صورتی یا قرمز) حتی به صورت جزئی کیت نباید مورد استفاده قرار گیرد.
- این کیت تنها برای مصارف تحقیقاتی طراحی شده و برای تشخیص طبی (IVD) مورد تایید نمی‌باشد.

## ۹. 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 ۱/۵ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

## ۱۰. احتیاط و نکات لازم

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) می‌باشند. 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.

## ۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش با این کیت، ۰/۵ میلی لیتر خون کامل (peripheral blood) می‌باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می‌تواند EDTA یا سیترات باشد. خون کامل را می‌توان تا ۴۸ ساعت 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 می‌ماند.

## ۱۲. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می‌شود. 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 نمی‌باشد.

مقادیر بالای بیلی‌روبین (تا حداکثر ۴/۵ میلی گرم در دسی لیتر) و چربی (تا حداکثر ۱۰۰۰میلی گرم در دسی لیتر) و نیز همولیز خون برای این آزمایش مزاحمتی ایجاد نمی‌کند.

## ۱۳. کنترل داخلی

هر فرد حامل ژن طبیعی یا جهش یافته فاکتور ۲ و یا هر دوی آن‌ها می‌باشد. 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 می‌کنند. در صورتی که فردی برای هر دو آلل طبیعی و جهش یافته منفی باشد، واکنش ناموفق بوده و آزمایش باید تکرار شود.

## ۱۴. 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)

## ۱۵. دستور کار PCR و مراحل آزمایش

ابتدا تمامی لوله ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا بطور کامل محتویات آن‌ها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن آن ها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.

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

**به هرلوله ۲۰ میکرولیتر از F2 RQ 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.

## ۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها

کیت F2 RQ جهت کار با دستگاه‌های Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

## ۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

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

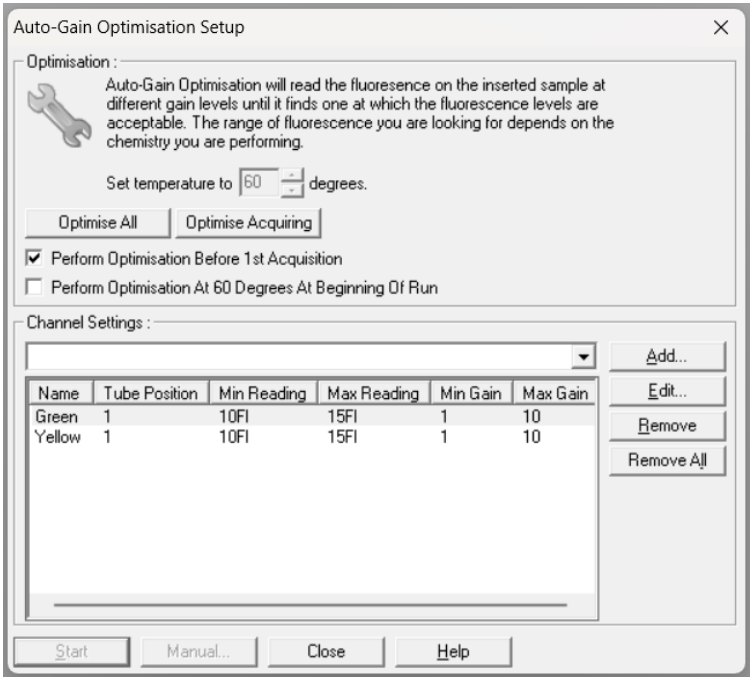
دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن با کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق وصل کنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

فایل تمپلیت F2 را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل F2 0.1 یا F2 0.2 را با توجه به نوع لوله استفاده شده انتخاب کنید.

نکته: مطابق تصویر برای تنظیم ضریب تابش در منوی نرم افزار، گزینه View، سپس Gain Optimisation را انتخاب کنید. در پنجره باز شده در Auto-Gain Optimisation Setup ابتدا گزینه Optimise Acquiring را بزنید. تنظیمات را دقیقا مطابق تصویر زیر برای هر دو کانال انجام دهید.

Tube Position را روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید تیوب شماره یک باید حاوی میکس F2 باشد).

گزینه Perform Optimisation Before 1st Acquisition را فعال کنید و پنجره را ببندید.




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 را وارد کنید. در ستون نوع نمونه با عنوان type، برای نمونه بیمار unknown و برای شاهدها Positive Control و برای نمونه کنترل منفی نیز می‌توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

## ۱۸. تنظیم دستگاه StepOne

نرم افزار دستگاه را باز کنید (StepOne software 2.*). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل داخل فلش کارت همراه کیت را انتخاب

کنید. (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت).
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) می‌توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی Define Targets and Samples می‌توانید 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.

## ۱۹. تنظیم سایر دستگاه ها

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

| Step | Temperature and time | Cycles |
|---|---|---|
| 1 | **95°C x 3 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 می‌باشند. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می‌باشد.

## ۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene

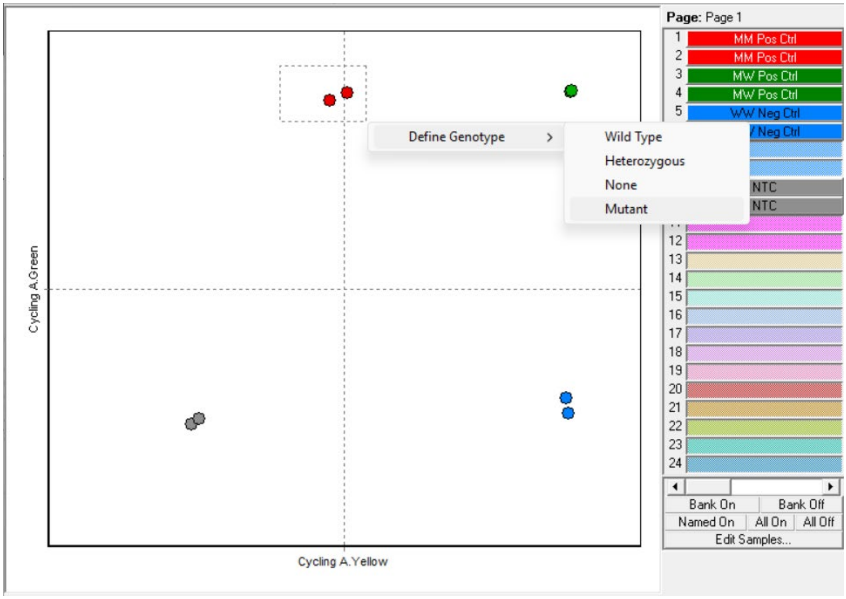
برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از

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.

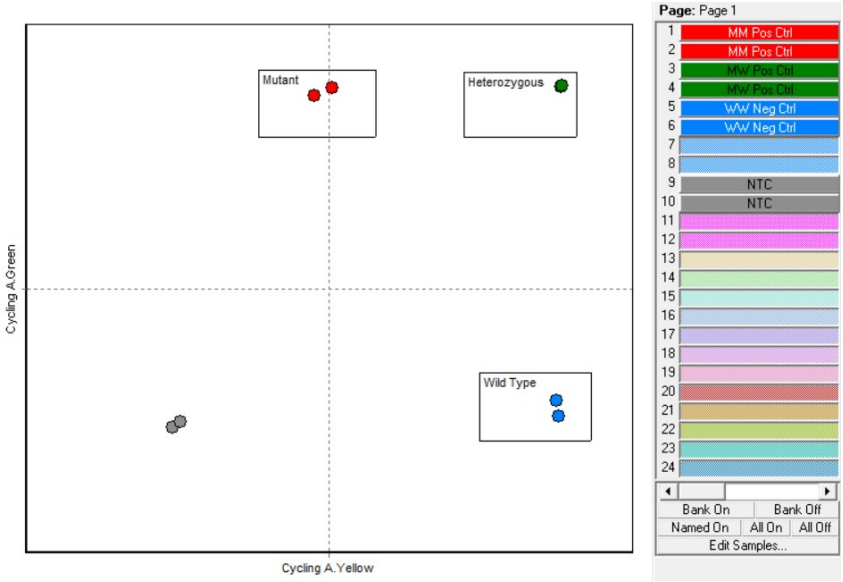
در پنجره های آنالیز، در قسمت سمت چپ پایین، نمودار پراکندگی نمونه ها را ملاحظه خواهید کرد؛ هر نقطه معرف یکی از نمونه ها می‌باشد. محور عمودی میزان فلورسانس سبز و محور افقی میزان فلورسانس زرد را نشان می‌دهد. توجه داشته باشید که کانال سبز به آلل Mutant یا M و کانال زرد به آلل طبیعی Wild type یا W اختصاص 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 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 می‌آید انتخاب کنید (تصویر یک).




**تصویر ۱.** تعریف ژنوتایپ های شاهدهای تست در دستگاه Rotor-Gene

پس از مشخص کردن و تعریف نواحی ذکر شده؛ علاوه بر شاهدها 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 دستگاه Rotor-Gene

**توجه! در صورتی که موقعیت شاهدها در نمودار با نمودار تصاویر 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 آزمایش باید تکرار شود!**

## ۲۱. 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 نمونه‌ها و شاهدها، ژنوتایپ نمونه‌ها را تعیین میکند.

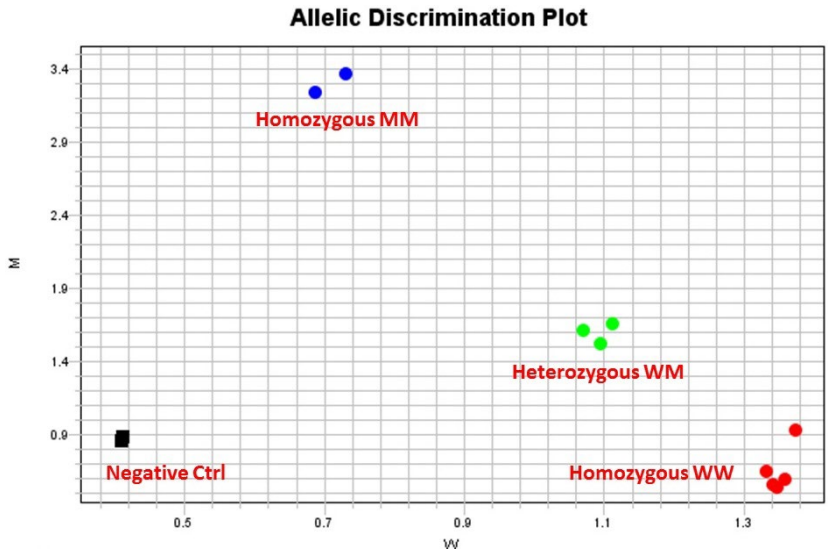
**توجه داشته باشید که نرم افزار دستگاه تنها در صورتی می‌تواند ژنوتایپ نمونه ها را تشخیص دهد که هر سه شاهد کیت و آب یا شاهد فاقد DNA در آزمایش استفاده شده باشند!**

**همچنین در نظر داشته باشید در قسمت Setup الل های MM، WM و WW باید تعریف شده باشد.**

برای ملاحظه نمودار مورد انتظار شاهدها به تصویر سه مراجعه کنید. هر نقطه معرف یکی از نمونه ها می‌باشد.

ژنوتایپ شاهدها 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 (×) 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 نمونه‌ها 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 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 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!**

## ۲۲. روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیکی یا شیمیایی بوده و می‌توان آنها را مستقیما به سطل زباله انتقال داد. اما نمونه های عفونی آزمایشگاه را در محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت حداقل یک شبانه روز قرار دهید و سپس آنها را به سطل زباله منتقل کنید.

## ۲۳. پشتیبانی فنی

برای ارتباط با بخش پشتیبانی فنی می‌توانید با شماره تلفن یا آدرس ایمیل زیر تماس حاصل فرمایید:

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱

Info@novingene.com

## ۲۴. اطلاعات تماس

شرکت نوین ژن پارس ویرا

آدرس: تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶

تلفن تماس:

۰۲۱-۸۸۸۳۷۳۹۳

۰۹۹۰۱۸۱۳۱۲۴

ایمیل: info@novingene.com

وبسایت: www.novingene.ir

## ۲۵. منابع


- Hotoleanu, C., 2017. Genetic risk factors in venous thromboembolism. Thrombosis and Embolism: from Research to Clinical Practice: Volume 1, pp.253-272.
- Kaushansky, K., 2021. Williams hematology. New York: Mcgraw Hill.
- Mackay, Ian M. "Real-time PCR in the microbiology laboratory." Clinical microbiology and infection 10, no. 3., 2004: 190-212.

- Varga, E.A. and Moll, S., 2004. Prothrombin 20210 mutation (factor II mutation). Circulation, 110(3), pp.e15-e18.


## ۲۶. توضیحات برچسب

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| RUO | جهت مصارف پژوهشی | | تولید کننده | | دستورالعمل برای استفاده را بررسی نمایید |
| LOT | کدبهر (شماره بچ) | Σ | تعداد <n> آزمون کافی | | تاریخ انقضاء |
| REF | شماره کاتالوگ | SN | شماره سریال | -10°C -30°C | محدوده دمایی |

***برای دریافت اطلاعات و منابع بیشتر، به وبسایت ما به نشانی www.novingene.ir مراجعه فرمایید یا با پشتیبانی تماس بگیرید.***

# Factor II RQ
# Kit Manual

Autumn 2025, Version 3.1

For Real-Time PCR Detection of Factor II (G20210A) mutation
For Research Use Only

24 (Cat# F2RQ24)
48 (Cat# F2RQ48)
96 (Cat# F2RQ96)
NG-WI-ASL-16-301

RUO

**NovinGene ParsVira**
No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.

Novin Gene

# Table of Contents


1. Introduction ..... 3
2. Intended Use ..... 3
3. Background Information ..... 3
4. Test Principle ..... 3
5. Kit Contents ..... 4
6. Packaging models ..... 4
7. Storage and Stability ..... 4
8. Product Use Limitations ..... 4
9. Additionally Required Materials ..... 5
10. General Precautions ..... 5
11. Specimen, Storage and Transport ..... 6
12. Interfering Substances ..... 6
13. Internal Control ..... 6
14. DNA Isolation ..... 6
15. PCR Protocol ..... 7
16. Devices and software ..... 7
17. Programming Rotor-Gene ..... 7

18. Programming StepOne ..... 8
19. Programming Other Machines ..... 9
20. Data Analysis: Rotor-Gene ..... 9
21. Data Analysis: StepOne ..... 11
22. Disposal Method ..... 13
23. Technical Support ..... 13
24. Contact Information ..... 14
25. References ..... 14
26. Symbols ..... 14

## 1. Introduction

Factor II RQ kit provides a ready-to-use Real-Time PCR test for the detection of F2 using Real-Time PCR (based on polymerase chain reaction). All required reagents are included in the PCR Mix provided in the kit.
This kit is for Research Use Only!

## 2. Intended Use

Factor II RQ kit is intended for detection of prothrombin G20210A (Factor II) mutation in human DNA. Detection is achieved using Real-Time PCR and is compatible with Rotor-Gene, StepOne and MIC machines.

## 3. Background Information

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 factor II gene.

## 4. Test Principle

The target sequence is detected using PCR, where primers specific to the target sequence amplify it. Real-Time PCR facilitates the detection of the amplified product through fluorescent-labeled probes. Therefore, monitoring fluorescence provides a means for detecting the target without requiring post-

amplification analysis. This eliminates the possibility of PCR product contamination.

## 5. Kit Contents

The kit contains a manual, a flash card and the following reagents:

| Label | Content | Quantity |
|---|---|---|
| F2 RQ Mix | PCR Mix* | 480 µl |
| Thrmb MM Ctrl | Homozygous Positive Control | 100 µl |
| Thrmb WM Ctrl | Heterozygous Positive Control | 100 µl |
| Thrmb WW Ctrl | Negative Control | 100 µl |
| Water | PCR Grade Water | 200 µl |

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

## 6. Packaging models

The kit is available in 24, 48, and 96 reactions of 25 microliters.

## 7. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiration date mentioned. Avoid repeated freeze-thaw more than three times to prevent reduced sensitivity.

## 8. Product Use Limitations

- This kit is intended to be used only by specially instructed and trained personnel.
- The user manual should be strictly followed, and any modification will invalidate the results.
- The kit and its contents should not be used past the expiration date on the package.
- The kit and its contents should not be used if there is any sign of pink or red color on the Warm Mark label.

- This kit is for Research use only and is not validated for IVD (in vitro diagnostics) applications.

## 9. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Tabletop microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease free 1.5ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

## 10. General Precautions

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 extracted DNA 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 while working.
- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cooling blocks instead.

## 11. Specimen, Storage and Transport

Whole blood (0.5ml) is the preferred sample. Whole 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 up to a few months.

## 12. Interfering Substances

Heparin (more than 10 IU/ml) affects the PCR. Blood collected in heparin containing tubes and samples of heparinized patients must not be used.
Elevated levels of bilirubin (≤4.5 mg/dl) and lipids (≤1000 mg/dl) and hemolytic samples do not influence the extraction and PCR.

## 13. 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.

## 14. 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.

## 15. PCR Protocol

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

## 16. Devices and software

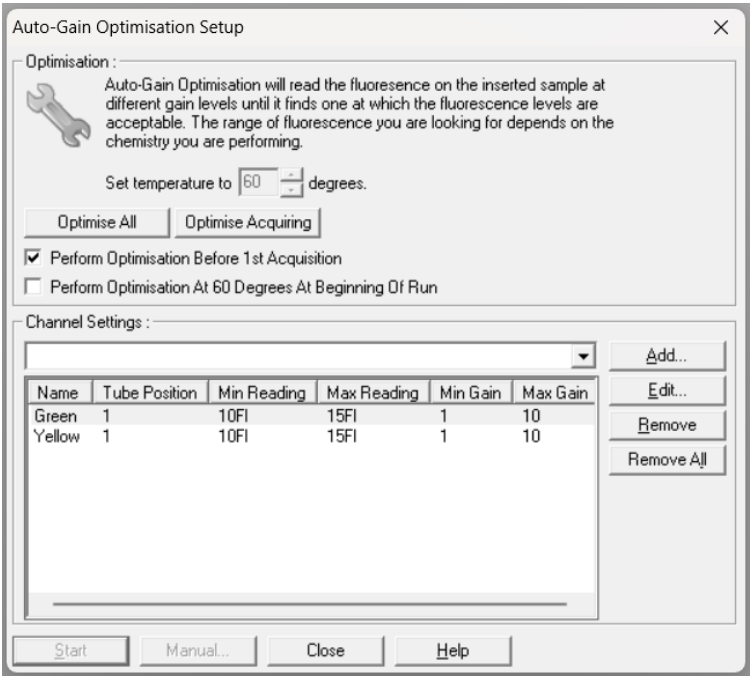
F2 RQ kit is designed to work with Rotor-Gene, StepOne and MIC.

## 17. Programming Rotor-Gene

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

Open the F2 template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); F2 0.1 is for strip tubes and F2 0.2 is for 0.2ml tubes. Program starts.

Note: For Gain Optimisation, in the View menu select the Gain Optimisation. Adjust the setting according to the below image.




Click on the Start button (Green button on the top menu). On the pop-up window click Start again and save the run file. Edit sample names.

## 18. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set-Up menu, click Template (provided in the flash card, or accessible by kit QR code). Click on "Plate Setup". Controls and a few samples are defined. You may change the plate setup 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 the desired location. Instrument will start shortly.

## 19. 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 3 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.

## 20. Data Analysis: Rotor-Gene

Before analyzing results, make sure that in the sample menu, the Positive controls have been defined as “Positive control”. Patient samples are defined as "unknown" and Negative control or no template control as "Negative Control" or "NTC" respectively.
Analyze data according to Rotor-Gene manual. 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”.
Please note that the device software can only detect the genotype of the samples if all three kit controls and water or a DNA-free control have been used in the test!
Also, make sure that in the Setup section, the alleles MM, WM, and WW are defined.
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 the Green channel and W allele in the 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.

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).

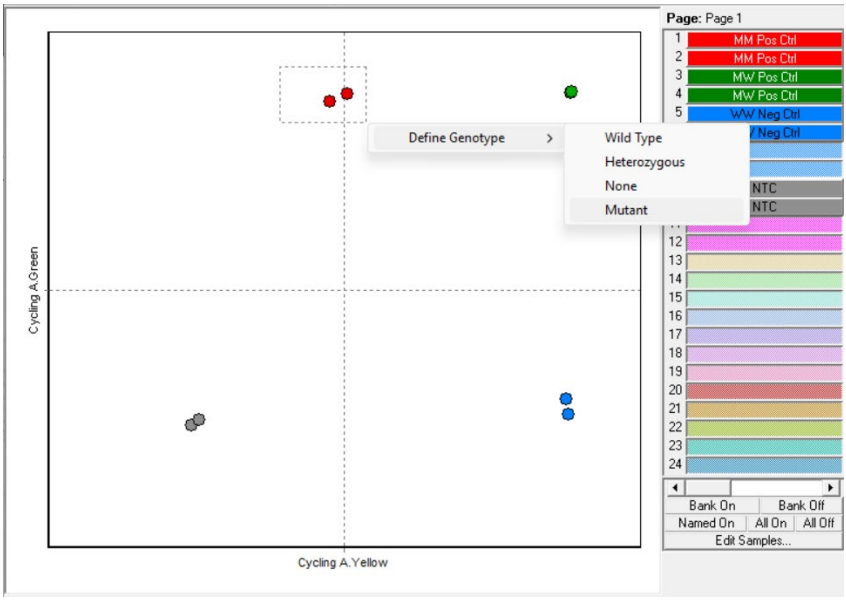



**Fig 1.** Defining genotypes of different controls of the test on Rotor-Gene

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

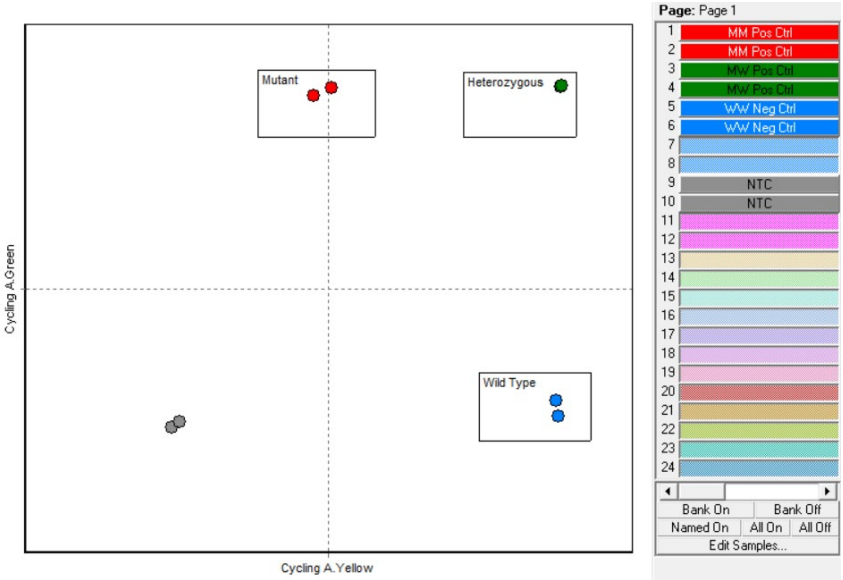



**Fig 2**. Typical scatter graph for controls and samples in Rotor-Gene

**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!**

## 21. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to StepOne manual. 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.

Please note that the device software can only detect the genotype of the samples if all three kit controls and water or a DNA-free control have been used in the test!
please ensure that the alleles MM, WM, and WW are defined in the Setup section.

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; 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.

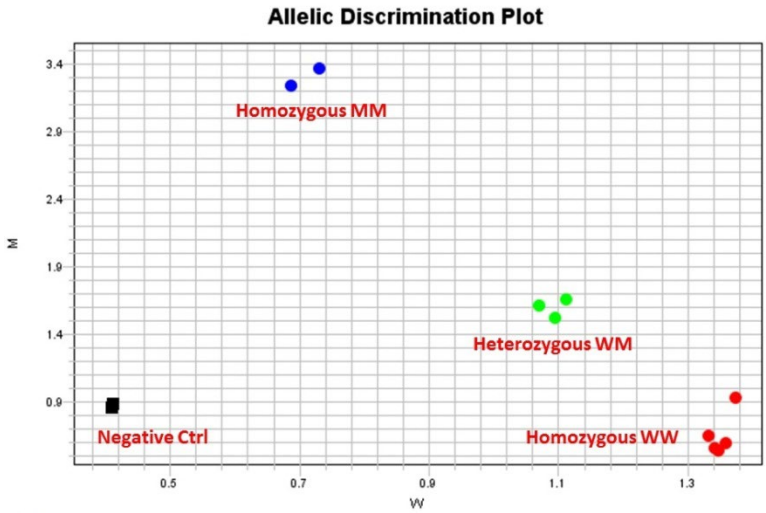



**Fig 3.** Typical graph for controls and samples on StepOne

**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!**

## 22. Disposal Method

The contents of the kit do not require any special treatment before disposal and can be directly discarded. Infectious specimens should be maintained in 5% Sodium Hypochlorite overnight and then discarded.

## 23. Technical Support

For technical support, contact us via
Phone +98-9936223241
Email: info@novingene.com

## 24. Contact Information

**NovinGene ParsVira**
Address: No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.
Tel: +98 21-88837393
+98 990-1813124
Email: info@novingene.com
Website: www.novingene.com

## 25. References

- Hotoleanu, C., 2017. Genetic risk factors in venous thromboembolism. Thrombosis and Embolism: from Research to Clinical Practice: Volume 1, pp.253-272.
- Kaushansky, K., 2021. Williams hematology. New York: Mcgraw Hill.
- Mackay, Ian M. "Real-time PCR in the microbiology laboratory." Clinical microbiology and infection 10, no. 3., 2004: 190-212.
- Varga, E.A. and Moll, S., 2004. Prothrombin 20210 mutation (factor II mutation). Circulation, 110(3), pp.e15-e18.

## 26. Symbols

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| RUO | Research use only | | Manufacturer | | Consult instructions for use |
| LOT | Lot number | Σ | Content sufficient for <n> tests | | Use-by date |
| REF | Catalogue number | SN | Serial number | -10°C -30°C | Temperature limit |

**For more information and resources please visit our website; www.novingene.com**