راهنمای کیت

PAI-1 RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۲/۰

جهت تشخیص پلی مورفیسم PAI-1 4G/5G

به روش Real-Time PCR

مخصوص تحقیقات

24 (Cat# PAIRQ24)

48 (Cat# PAIRQ48)

96 (Cat# PAIRQ96)

NG-WI-ASL-22-200

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..... ۴
۵. محتویات کیت..... ۴
۶. مدل های بسته بندی..... ۵
۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت..... ۵
۸. محدودیت کاربرد..... ۵
۹. سایر موارد مورد نیاز..... ۶
۱۰. احتیاط و نکات لازم..... ۶
۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگه داری و انتقال آن..... ۷
۱۲. عوامل مزاحم..... ۷
۱۳. کنترل داخلی..... ۸
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..... ۱۱
۱۹. تنظیم سایر دستگاه ها..... ۱۲

۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene ۱۲
۲۱. آنالیز نتایج StepOne ۱۵
۲۲. روش امحاء ۱۸
۲۳. پشتیبانی فنی ۱۸
۲۴. اطلاعات تماس ۱۸
۲۵. منابع ۱۹
۲۶. توضیحات برچسب ۱۹

۱. مقدمه

کیت PAI-1 RQ جهت تشخیص پلی مورفیسم 4G/5G مربوط به PAI-1 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 PAI-1 RQ امکان تشخیص پلی مورفیسم 4G/5G مربوط به PAI-1 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

PAI-1 یا Plasminogen Activator Inhibitor 1 یک گلیکوپروتئین با وزن ۵۲ کیلو دالتون می‌باشد. این پروتئین مهمترین مهارکننده عوامل فعال کننده پلاسمینوژن می‌باشد و لذا مهار کننده فیبرینولیز می‌باشد و از حل شدن لخته خون ممانعت می‌کند. ژن PAI-1 روی کروموزوم شماره ۷ قرار دارد و شامل ۹ اگزون می‌باشد. در نقاط متعددی از این ژن پلی مورفیسم مشاهده شده است که مهمترین آنها در ناحیه بالا دستی ژن در موقعیت ۶۷۵- قرار دارد. این پلی‌مورفیسم شامل حذف یا افزایش یک گوانین بوده و تحت عنوان 4G/5G شناخته می شود. به آلل 5G هم عوامل افزایش دهنده و هم عوامل کاهش دهنده نسخه برداری می‌تواند متصل شوند. اما به آلل 4G فقط عوامل افزایش دهنده نسخه برداری می‌توانند متصل شوند و بنابراین سبب افزایش بیان ژن PAI-1 می‌گردد. در حال حاضر آلل 4G را عاملی مستعد کننده برای بیماری های متعدد

و متفاوتی در نظر می‌گیرند که از جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: deep vein thrombosis، آترواسکلروز و سکته قلبی، سقط جنین، سرطان، عفونت های بافتی و همچنین آسم.

۴. اساس آزمایش

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

برچسب	محتوا	حجم
PAI-1 RQ Mix	میکس آماده برای PCR *	۴۸۰ میکرولیتر
4G/4G Ctrl	شاهد هموزیگوت 4G/4G	۱۰۰ میکرولیتر
4G/5G Ctrl	شاهد هتروزیگوت 4G/5G	۱۰۰ میکرولیتر
5G/5G Ctrl	شاهد هموزیگوت 5G/5G	۱۰۰ میکرولیتر
water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

*۱، ۲ یا ۴ 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 می‌شود.

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

۸. محدودیت کاربرد

- این کیت تنها برای استفاده توسط کاربران حرفه ای 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 (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) می باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود داشته باشند به ویژه سمپلر. 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.
- پیش از باز کردن درب لوله های درون کیت، آنها را روی یخ خرد شـــده قرار دهید تا کاملا ذوب شـــده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شـــدن محتویات هر لوله اطمینان حاصـــل کنید. ســـپس برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشـه روی یخ خرد شـده 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.

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش PAI-1 4G/5G با این کیت، خون محیطی (peripheral blood) می‌باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می تواند EDTA یا سیترات باشد. خون کامل را می‌توان تا ۴۸ ساعت در ۴ درجه نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود. برای نگهداری نمونه برای مدت طولانی تر از چند روز بهتر است آن را به حجم های کوچک تقسیم نموده و سپس در دمای ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری نمود. در چنین شرایطی نمونه تا چند ماه پایدار می‌ماند.

DNA را می‌توان مستقیماً از خون کامل یا از بافی (buffy coat) استخراج کرد.

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

در آزمایش فاکتور PAI-1 4G/5G هر یک از دو آلل طبیعی یا جهش یافته می‌تواند به عنوان کنترل داخلی عمل کند زیرا هر فردی حامل یک و یا هر دو نوع این پلی‌مورفیسم می‌باشد، بنابراین همیشه باید نتیجه این آزمایش حداقل برای یکی از آن ها مثبت باشد. در صورتی که فردی برای هر دو نوع پلی مورفیسم 4G یا 5G منفی باشد، آزمایش ناموفق بوده و باید تکرار شود.

۱۴. استخراج DNA

برای اســـتخراج DNA از نمونه پلاســـما از روش ها و کیت های 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. دستورکار 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 مواد داخل آنها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.

تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد

آزمایش، سه لوله برای شاهدهای مثبت و منفی و یک لوله نیز برای NTC در نظر بگیرید.

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

به هر لوله ۲۰ میکرولیتر از PAI-1 RQ Mix اضافه کنید. سپس ۵ میکرولیتر از نمونه و یا شاهد یا آب به هر لوله اضافه کنید و درب 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.

۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها

کیت PAI-1 RQ جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

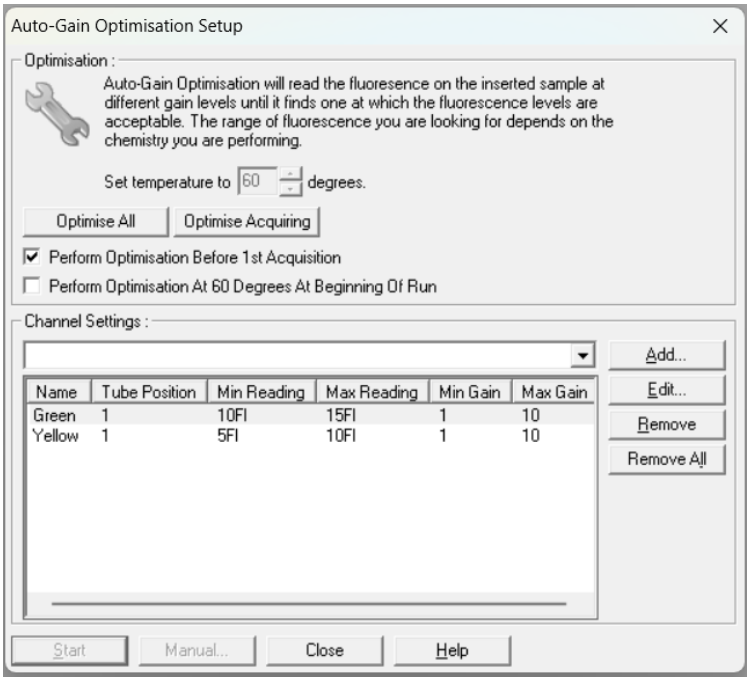
ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

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

فایل تمپلیت PAI-1 را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل PAI-1 0.1 یا PAI-1 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 PAI-1 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 را انتخاب کرده و سپس وارد منوی Assign Targets and Samples شوید. شاهدها و چند نمونه از پیش تعریف شده اند. آنها 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 نیز اضافه کنید و نام نمونه ها را نیز 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.

در صورت عدم استفاده از Template آماده، در تنظیمات Set Up دستگاه، درExperiment properties، نوع تست را حتما Genotyping انتخاب کرده تا در Run Method دو مرحله Pre PCR Read و Post PCR Read در برنامه دمایی نمایان شود. سپس مراحل را مطابق جدول زیر تنظیم نمایید. در صورت عدم انتخاب Genotyping نرم افزار امکان تفسیر نتایج به صورت Allelic Discrimination را نخواهد داشت.

Step	Temperature and time	Cycles
1	**65°C x 30 sec**	Pre PCR Read
2	**95°C x 3 min**	1
3	**95°C x 15 sec**	45
	65°C x 40 sec	
4	**65°C x 30 sec**	Post PCR Read

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**	50
	65°C x 40 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۵ درجه و برای رنگ های FAM و VIC تنظیم شود.

PAI-1 RQ Mix حاوی ROX است. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می‌باشد.

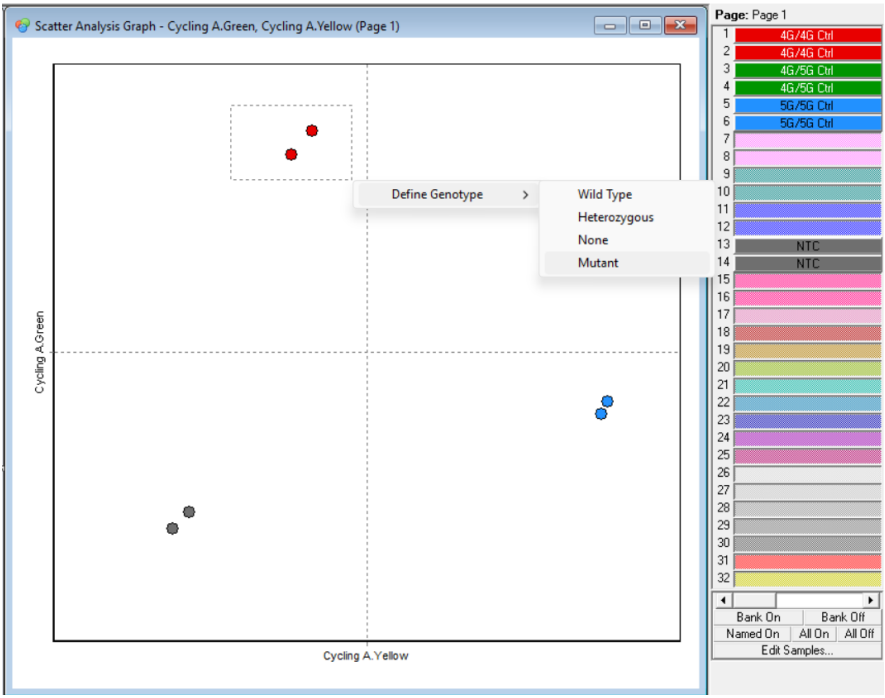
۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene

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 و آب یا شاهد بدون DNA در آزمایش استفاده شده باشند.

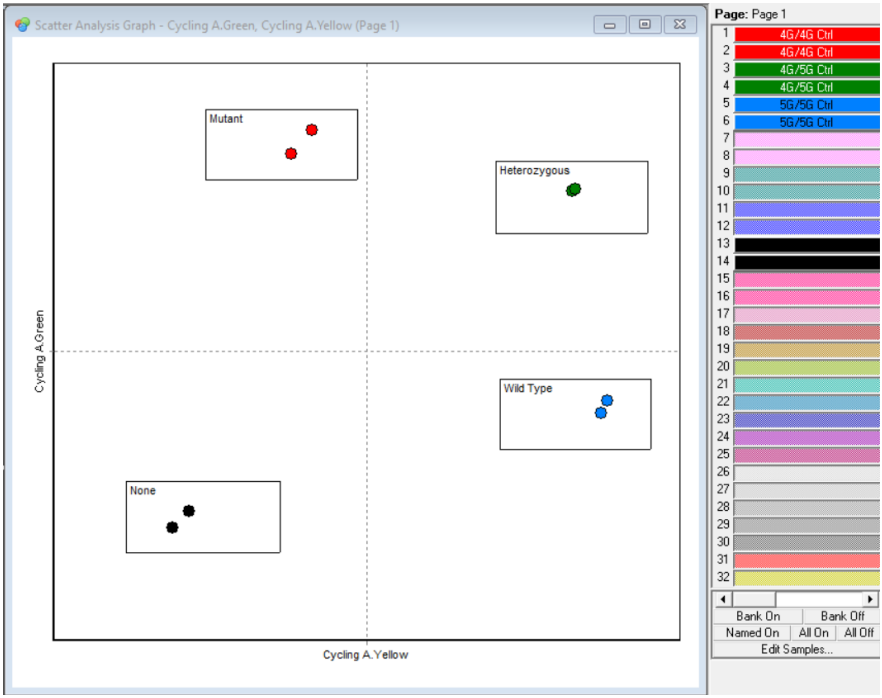
در پنجره های آنالیز، نمودار پراکندگی نمونه ها را ملاحظه خواهید کرد؛ هر نقطه معرف یکی از نمونه ها می‌باشد. محور عمودی میزان فلورسانس سبز و محور افقی میزان فلورسانس زرد را نشان می‌دهد. توجه داشته باشید که کانال سبز به آلل Mutant یا 4G و کانال زرد به آلل طبیعی Wild type یا 5G اختصاص دارد. تابش سبز برای نمونه های هموزیگوت Mutant یا 4G/4G 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 5G/5G 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 4G/5G 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).



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

پس از مشخص کردن و تعریف نواحی ذکر شده؛ می‌توانید 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 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 صورتی که 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 میزان فلورسانس نمونه ها و شاهدها، ژنوتایپ نمونه ها 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 بدون DNA در آزمایش استفاده شده باشند!

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

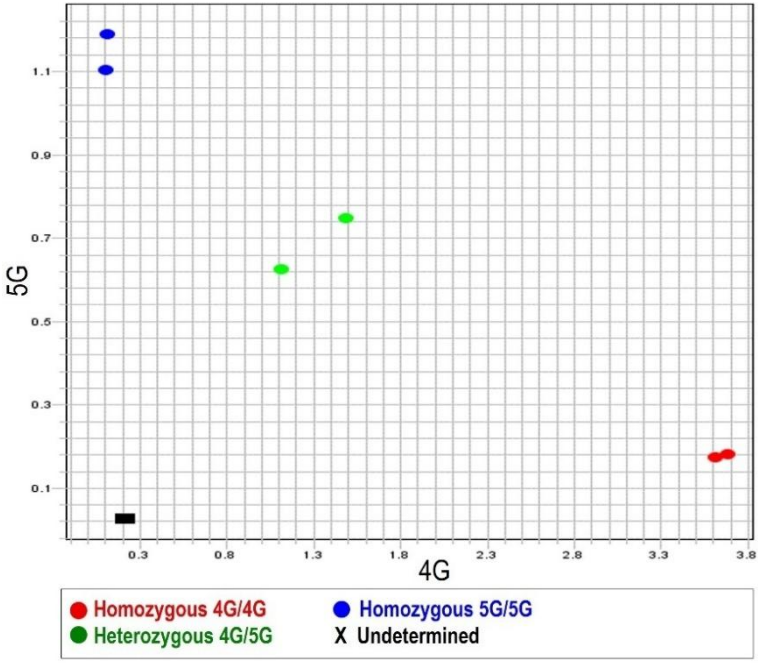
برای ملاحظه نمودار مورد انتظار شاهدها به تصویر سه مراجعه کنید. هر نقطه معرف یکی از نمونه ها می‌باشد. ژنوتایپ شاهدها و نمونه ها همچنین با رنگ نقاط نیز از هم تفکیک شده اند. در قسمت Plate Setup، Assign را انتخاب کرده و برای هر یک از شاهدها، در قسمت Task آلل مرتبط را انتخاب کنید. در این صورت نرم افزار پس از آنالیز ژنوتایپ هر یک از نمونه ها را باتوجه به شاهدها تعیین و با رنگ مربوطه نشان می‌دهد.

هموزیگوت **4G/4G** با قرمز، هموزیگوت **5G/5G** با آبی، هتروزیگوت **5G/4G** با سبز، و نهایتاً نمونه شاهد بدون DNA (آب) با رنگ سیاه نشان داده می‌شوند. ضربدر (×) سیاه نیز نشانگر نمونه ای می باشد که ژنوتایپ آن قابل شناسایی نبوده است.

توجه داشته باشید که کانال FAM به آلل 4G و کانال VIC به آلل 5G اختصاص دارد. ضمنا برای هر نمونه ای در هر دو کانال FAM و VIC تابش مشاهده می‌شود ولی نسبت تابش FAM به VIC متفاوت است. تابش FAM برای نمونه های هموزیگوت 4G/4G چند برابر تابش VIC می‌باشد. در صورتی که در نمودار، محور عمودی میزان فلورسانس VIC و محور افقی میزان فلورسانس FAM را نشان دهد، نمونه های هموزیگوت 4G/4G در ناحیه سمت راست و پایین نمودار یا جنوب شرقی مشاهده خواهند شد. در مقابل تابش VIC برای نمونه های 5G/5G چند برابر تابش FAM است و این نمونه ها در سمت چپ و بالای نمودار یا شمال غربی

تجمع پیدا می‌کنند.

در نمونه های هتروزیگوت یا 5G/4G 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 نمونه‌ها در ناحیه سمت چپ پایین نمودار یا جنوب غربی دیده می شوند (تصویر سه).



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

توجه! در صورتی که موقعیت شاهدها در نمودار با آنچه در این راهنما نشان داده شده متفاوت باشد و یا در صورتی که شاهدها 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!

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 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

- Heiman, M., Gupta, S., Khan, S.S., Vaughan, D.E. and Shapiro, A.D., 2017. Complete plasminogen activator inhibitor 1 deficiency.

- Mackay, Ian M., 2004. "Real-time PCR in the microbiology laboratory." Clinical microbiology and infection 10, no. 3: 190-212.
- Teruya, J., 2021. Management of bleeding patients. Cham: Springer.
- Vaughan, D.E., 2005. PAI-1 and atherothrombosis. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 3(8), pp.1879-1883.
- Zhang, Q., Jin, Y., Li, X., Peng, X., Peng, N., Song, J. and Xu, M., 2020. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphisms and risk of venous thromboembolism–a meta-analysis and systematic review. Vasa.

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.

PAI-1 RQ Kit Manual

Autumn 2025, Version 2.0

For Real-Time PCR Detection of PAI-1 4G/5G polymorphism
For Research Use Only

24 (Cat# PAIRQ24)
48 (Cat# PAIRQ48)
96 (Cat# PAIRQ96)
NG-WI-ASL-22-200

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 Substances Materials 5
10. General Precautions 5
11. Specimen, Storage and Transport 6
12. Interfering 6
13. Internal Control (IC) 6
14. DNA Isolation 6
15. PCR Protocol 7
16. Devices and software 7
17. Programming Rotor-Gene 7
18. Programming StepOne 9
19. Programming Other Machines 9

20. Data Analysis: Rotor-Gene 9
21. Data Anaylsis: StepOne 12
22. Disposal Method 14
23. Technical Support 15
24. Contact Information 15
25. References 15
26. Symbols 16

1. Introduction

PAI-1 RQ kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting of PAI-1. All required reagents are included in the PCR Mix provided in the kit.
This kit is for Research Use Only!

2. Intended Use

PAI-1 RQ kit is intended for detecting 4G/5G polymorphism in promoter region of PAI-1 gene in human genomic DNA. Detection is achieved using Real-Time PCR and is compatible with Rotor-Gene or StepOne and MIC machines.

3. Background Information

PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1) is a 52 kDa glycoprotein. It is the main inhibitor of activators of plasminogen, and hence fibrinolysis and blood clot degradation. PAI-1 gene is located on chromosome 7 and consists of 9 exons. It includes many variations. The most significant variation, however, lies in the promoter region at -675, which is a single guanine base insertion/deletion known as 4G/5G polymorphism. While 5G allele binds both transcription activator and repressor, 4G allele only binds activator and leads to higher expression of PAI-1. 4G allele is considered a predisposing factor and has been related to various clinically important conditions including deep vein thrombosis, atherosclerosis and myocardial infarction, cancer, sepsis, miscarriage, and asthma.

4. Test Principle

The target sequence is detected using PCR, where primers specific to the target sequence amplify its unique sequence. 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
PAI-1 RQ Mix	Ready to use PCR Mix*	480 µl
4G/4G Ctrl	4G/4G Homozygous Control	100 µl
4G/5G Ctrl	4G/5G Heterozygous Control	100 µl
5G/5G Ctrl	5G/5G Homozygous Control	100 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

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

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

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 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 after.

- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cold blocks instead.

11. Specimen, Storage and Transport

The required sample for this test is Whole blood. Sample should be collected in sterile condition in proper tubes containing EDTA or citrate as anticoagulant. Whole blood should be shipped and stored at +4°C (stable for 3 days). For long term storage, sample should be aliquoted and stored at -20°C which remains stable for few months. DNA can be extracted from whole blood or buffy coat.

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 (IC)

Either wild type or mutant alleles may function as internal control for this assay as any patients carry 4G or 5G or both alleles. If a patient is negative for both, then the test is not valid and should be repeated.

14. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend the following:

- 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)

15. PCR Protocol

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

Pipette 20µl of PAI-1 RQ Mix directly to each tube followed by adding 5µl of sample or control or water.

Cap the tubes and visually inspect to make ensure all are capped securely. Place the tubes in the machine.

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

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

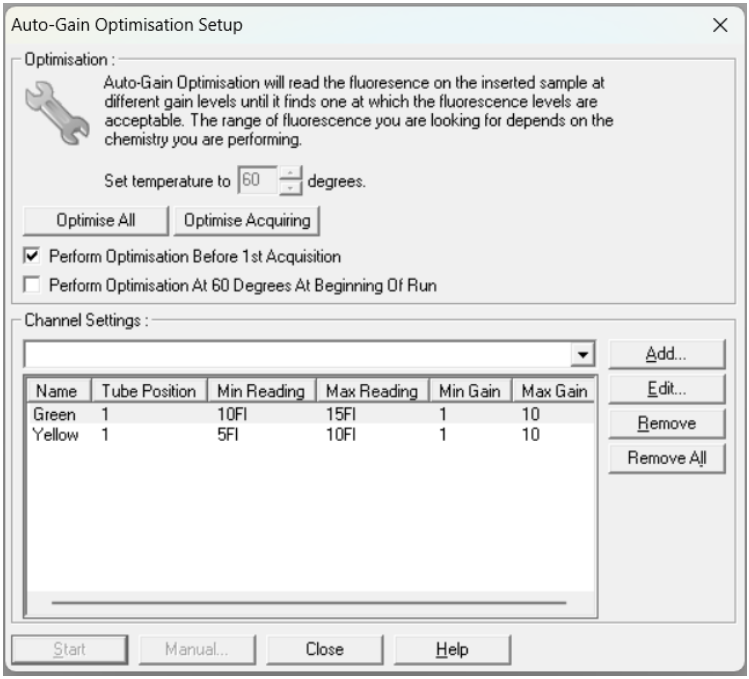
PAI-1 RQ kit is designed to work with Rotor-Gene, StepOne and MIC.

17. Programming Rotor-Gene

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

Open the PAI-1 template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); PAI-1 0.1 is for strip tubes and PAI-1 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 on Template (provided in the flash card, or accessible by kit QR code). One negative control, 3 positive controls and some samples are defined. You may change the plate set up by using right-click options (copy, paste, clear). You may also add /remove samples or

change sample name on “Define Targets and Samples” menu. When finished, click on “Start Run” and save the experiment to the desired location. Instrument will start shortly.
Alternatively, in Setup menu, Genotyping option could be selected. Assign controls as directed by StepOne manual and set the run parameters according to the following table:

Step	Temperature and time	Cycles
1	**65°C x 30 sec**	Pre-PCR Read
2	**95°C x 3 min**	1
3	**95°C x 15 sec**	45
	65°C x 40 sec	
4	**65°C x 30 sec**	Post-PCR Read

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**	50
	65°C x 40 sec	

Fluorescence should be collected at 65°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 the 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.

In the “Scatter Graph” window, each dot represents one sample. The vertical axis shows the Green fluorescence and horizontal axis is for the Yellow fluorescence. Note that 4G allele is detected in the Green channel and 5G allele in Yellow channel.

Therefore, samples are located in four regions of the graph. 4G/4G samples with high Green and low Yellow fluorescence gather in upper left; 5G/5G samples with low Green fluorescence and high Yellow gather in lower right; 4G/5G samples with average Green and 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, holding the right click, draw a rectangle around each control. Each box represents one of the above mentioned regions. Label 4G/4G genotype region as “Mutant”, 4G/5G as “Heterozygous”, 5G/5G as “Wild Type” and Negative Control as “None”(Figure 1).

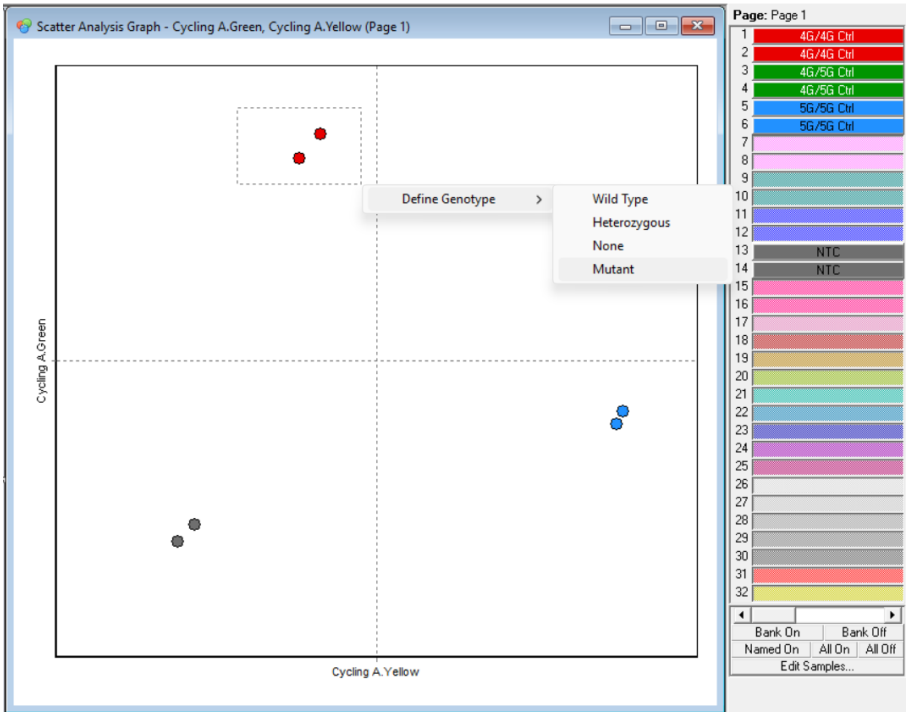


Fig 1. Defining genotypes of different controls of the test on Rotor-Gene

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

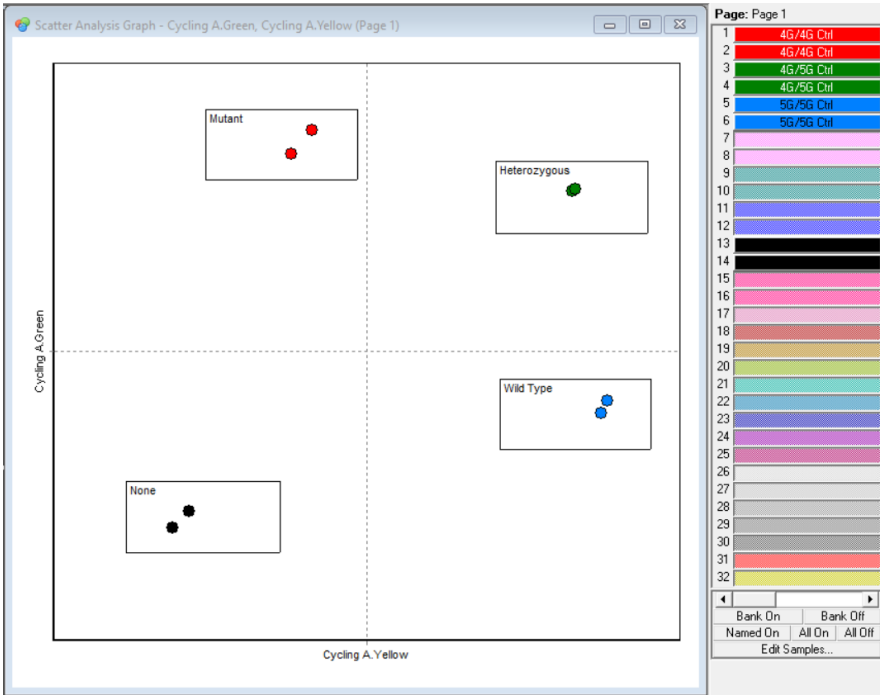


Fig 2. Typical scatter graph for controls and samples on Rotor-Gene

Note! If the 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 Anaylsis: 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. In order to analyze samples, In Plate Setup, select Assign, and define Task for each Control based on their alleles. All samples are color coded based on their genotype as Red for **4G/4G**, blue for **5G/5G**, Green for **5G/4G**, and Black box for control with no DNA or NTC. Unknown samples will be marked with black "×".

Note that the vertical axis shows the VIC fluorescence and horizontal axis is for the FAM fluorescence. Accordingly, 4G allele is detected in the FAM channel and 5G allele in the VIC channel. Therefore, samples are located in four regions of the graph. 5G/5G samples with high VIC and low FAM fluorescence gather in upper left; 4G/4G samples with high FAM fluorescence and low VIC gather in lower right; 5G/4G 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 (Figure 3).

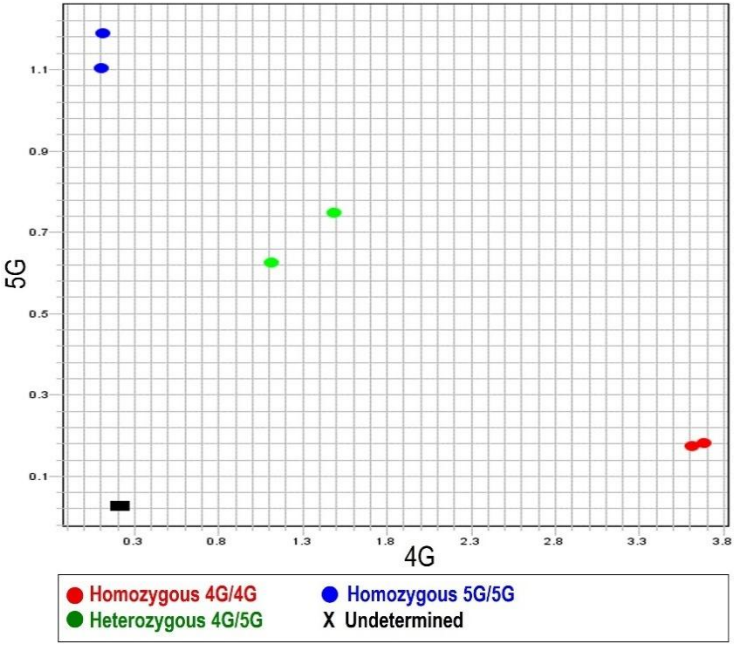


Fig 3. Typical graph for controls and samples on StepOne

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

- Teruya, J., 2021. Management of bleeding patients. Cham: Springer.
- Heiman, M., Gupta, S., Khan, S.S., Vaughan, D.E. and Shapiro, A.D., 2017. Complete plasminogen activator inhibitor 1 deficiency.
- Vaughan, D.E., 2005. PAI-1 and atherothrombosis. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 3(8), pp.1879-1883.
- Zhang, Q., Jin, Y., Li, X., Peng, X., Peng, N., Song, J. and Xu, M., 2020. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphisms and risk of venous thromboembolism–a meta-analysis and systematic review. Vasa.
- Mackay, Ian M., 2004. "Real-time PCR in the microbiology laboratory." Clinical microbiology and infection 10, no. 3: 190-212.

26. Symbols

RUO Research use only	Manufacturer	Consult instructions for use
LOT Lot number	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