راهنمای کیت ترومبو 4X
(Thrombo4X Kit)

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۱/۱

جهت تشخیص جهش های Factor II, Factor V Leiden ,MTHFR C677T
MTHFR A1298C به روش Multiplex Real-Time PCR
جهت کار با دستگاه Rotor-Gene
مخصوص تحقیقات

24 (Cat#T4X24)
48 (Cat#T4X48)
96 (Cat#T4X96)
NG-WI-ASL-60-100

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..... ۵
۶. مدل های بسته بندی..... ۵
۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت..... ۵
۸. محدودیت کاربرد..... ۶
۹. سایر موارد مورد نیاز..... ۶
۱۰. احتیاط و نکات لازم..... ۷
۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگه داری و انتقال آن..... ۸
۱۲. عوامل مزاحم..... ۸
۱۳. کنترل داخلی..... ۸
۱۴. استخراج DNA..... ۹
۱۵. دستورکار PCR و مراحل آزمایش..... ۹
۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها..... ۱۰
۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene..... ۱۰
۱۸. تنظیم سایر دستگاه ها..... ۱۲
۱۹. آنالیز نتایج Rotor-Gene..... ۱۲

۲۰. روش امحاء..... ۳۰
۲۱. پشتیبانی فنی..... ۳۰
۲۲. اطلاعات تماس..... ۳۱
۲۳. منابع..... ۳۱
۲۴. توضیحات برچسب ۳۲

۱. مقدمه

کیت Thrombo4X جهت تشخیص جهش‌های مربوط به پروترومبین یا فاکتور۲ (G20210A)، فاکتور ۵ لیدن (G1691A)، MTHFR C677T و MTHFR A1298C به روش Real-time PCR طراحی شده است. در این روش، DNA به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می‌شود. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی کاربرد دارد.

۲. حیطه کاربرد

کیت Thrombo4X امکان تشخیص جهش‌های مربوط به پروترومبین یا فاکتور۲ (G20210A)، فاکتور ۵ لیدن (G1691A)، MTHFR C677T و MTHFR A1298C را در DNA انسانی به روش Real-Time PCR فراهم می‌کند. این کیت جهت استفاده با دستگاه Rotor-Gene و MIC طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

ترومبوفیلی یا همان افزایش انعقاد پذیری یک اختلال ارثی یا اکتسابی است که در آن خطر انعقاد غیر طبیعی خون یا ترومبوز افزایش می‌یابد. ترومبوفیلی ارثی شامل جهش در ژن‌های فاکتور ۲ (پروترومبین)، فاکتور ۵ لیدن، فاکتور VIII، MTHFR، فیبرینوژن، پلاسمینوژن، آنتی ترومبین III ، پروتئین S، پروتئین C می‌باشد.

فاکتور۵ لیدن معرف یک ناهنجاری با الگوی اتوزومی غالب در سیستم انعقاد خون می‌باشد که ناشی از جهش نقطه ای G1691 (R506Q) در ژن فاکتور ۵ می‌باشد. در حدود سه تا هشت درصد سفید پوستان و ۲۰ درصد افراد مبتلا به Venous thromboembolism (VTE) در یکی از آلل‌های خود این جهش را

دارند (هتروزیگوت) و تقریبا یک نفر از هر پنج هزار نفر و ۰/۱ درصد از افراد مبتلا به VTE در هر دو آلل خود این جهش را دارد (هموزیگوت). خطر ابتلا به ترومبوز وریدی در افراد هتروزیگوت ۷ برابر و در افراد هموزیگوت ۸۰ برابر افزایش می یابد. فاکتور ۵ لیدن همچنین با افزایش ۲ تا ۳ برابری خطر سقط جنین مرتبط است.

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.

آنزیم متیلن تترا هیدروفولات ردوکتاز Methylenetetrahyrofolate reductase (MTHFR) در تنظیم متابولیسم فولات (folate) و هموسیستئین (homocysteine) نقش دارد. جایگزینی C677T در ژن این آنزیم، فعالیت آن را به میزان ۳۰ تا ۶۵٪ کاهش می دهد. جایگزینی A1298C نیز باعث کاهش حدود ۱۵ تا ۳۰٪ در فعالیت این آنزیم می شود. لذا این جایگزینی ها از مهم ترین عوامل ژنتیکی موثر بر میزان هموسیستئین خون و متابولیسم آن محسوب می‌شوند. شیوع این جایگزینی در جوامع مختلف متفاوت و بین ۴٪ تا ۵۰٪ متغیر می باشد.

۴. اساس آزمایش

در این کیت، شناسایی فاکتور ژنتیکی با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز Polymerase Chain Reaction/PCR انجام می‌شود. طی این واکنش توالی مورد نظر 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
F2-F5 Mix	میکس آماده برای فاکتورهای ۲ و ۵ *	۴۸۰ میکرولیتر
MTHFR Mix	میکس آماده برای MTHFR 1298, 677*	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 می‌باشد.

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 حرفه‌ای 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) 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 سانتریفیوژ 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 (whole 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 چند روز در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود. برای نگهداری نمونه در زمان های طولانی تر، آن را می‌توان 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.

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 ۱۰۰۰ میلی گرم در دسی لیتر) و نیز همولیز خون برای این آزمایش مزاحمتی ایجاد نمی‌کند.

۱۳. کنترل داخلی

با توجه به اینکه چهار پلی‌مرفیسم فاکتور۲، فاکتور۵، MTHFR C677T و MTHFR A1298C در این کیت بررسی می‌شود و هر فرد حامل ژن های

طبیعی یا جهش یافته 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 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.

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 آنها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.

این کیت حاوی دو میکس می‌باشد. میکس **F2-F5** برای تشخیص آلل‌های فاکتور ۲ و ۵ و میکس **MTHFR** برای تشخیص آلل های MTHFR A1298C و MTHFR C677T. برای هر میکس یک سری لوله جداگانه قرار دهید. در هر سری علاوه بر یک لوله برای نمونه‌ی هر بیمار، چهار لوله نیز برای کنترل های WW و WM و MM و آب در نظر بگیرید. تعداد مورد نیاز لوله ها را روی بلوک آلومینیوم سرد بگذارید.

به هرلوله سری اول، ۲۰ میکرولیتر از F2-F5 Mix و به هر لوله سری دوم،

۲۰ میکرولیتر از MTHFR Mix اضافه نمایید. سپس ۵ میکرولیتر از DNA نمونه و یا کنترل ها یا آب به هر لوله اضافه کنید. درپوش لوله ها را ببندید. سپس آنها را مطابق شماره ها 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 Thrombo4X RQجهت کار با دستگاه Rotor-Gene و MIC طراحی شده است.

۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

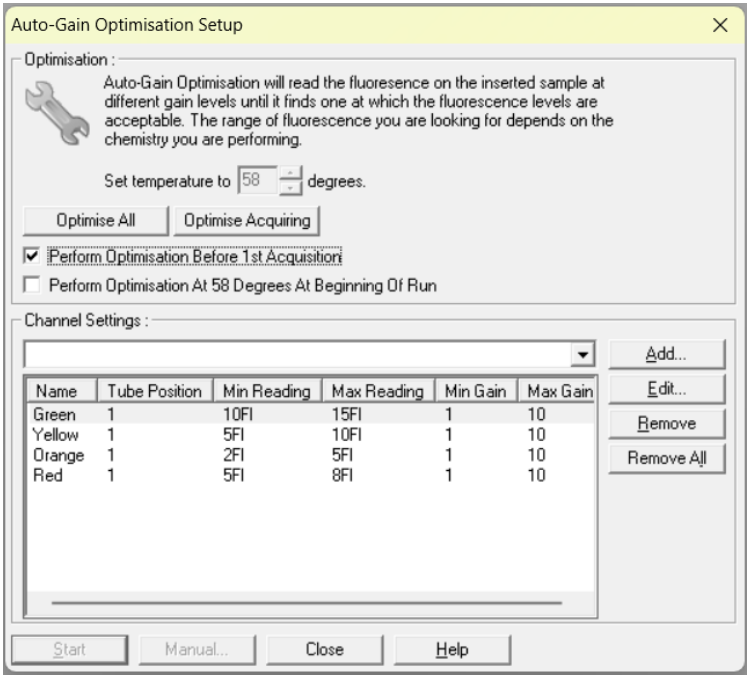
ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

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 Thrombo4X را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل Thrombo4X 0.1 یا Thrombo4X 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 چهار کانال انجام دهید. Tube Position را روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید تیوب شماره یک باید حاوی

میکس F2-F5 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 شروع به کار کند. در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه یا کنترل 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 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
	57°C x 30 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۵۷ درجه و برای رنگ های FAM، VIC، ROX و Cy5 تنظیم شود.

توجه داشته باشید که Mix ها فاقد ROX به عنوان نرمال کننده است. لذا گزینه استفاده از این رنگ به عنوان نرمال کننده (normalizer) باید غیرفعال باشد.

۱۹. آنالیز نتایج Rotor-Gene

آنالیز نتایج بر اساس واکنش یا عدم واکنش نمونه در کانال‌های مختلف انجام می‌شود. به طور خلاصه هنگام استفاده از میکس F2-F5 آلل طبیعی فاکتور پنج در کانال VIC و آلل جهش یافته آن در کانال FAM واکنش نشان می دهد. همزمان با همین میکس آلل طبیعی فاکتور دو در کانال ROX و آلل جهش یافته آن در کانال Cy5 واکنش می‌دهد.

همچنین با میکس MTHFR آلل طبیعی MTHFR1298 در کانال VIC و آلل جهش یافته در کانال FAM واکنش نشان میدهد. با همین میکس آلل طبیعی MTHFR677 در کانال ROX و آلل جهش یافته آن در کانال Cy5 واکنش خواهد داشت. موارد فوق به طور خلاصه در جدول زیر ذکر شده است.

Mix	Target	FAM	VIC	Cy5	ROX	Results
F2-F5 Mix	F5	+	-			F5 MM
		+	+			F5 WM
		-	+			F5 WW
	F2			+	-	F2 MM
				+	+	F2 WM
				-	+	F2 WW
MTHFR Mix	1298	+	-			1298 MM
		+	+			1298 WM
		-	+			1298 WW
	677			+	-	677 MM
				+	+	677 WM
				-	+	677 WW
		-	-	-	-	NTC

با توجه به نکات فوق نتایج این تست را به دو روش زیر می‌توان آنالیز نمود:

الف) آنالیز با بررسی نمودار پراکندگی (Scatter Graph)

ب) آنالیز با بررسی فلورسانس نهایی (EndPoint)

هر یک از روش های فوق در ادامه توضیح داده می‌شود.

الف) آنالیز نتایج با بررسی نمودار پراکندگی

آنالیز نمودار پراکندگی جهت بررسی فاکتور ۵:

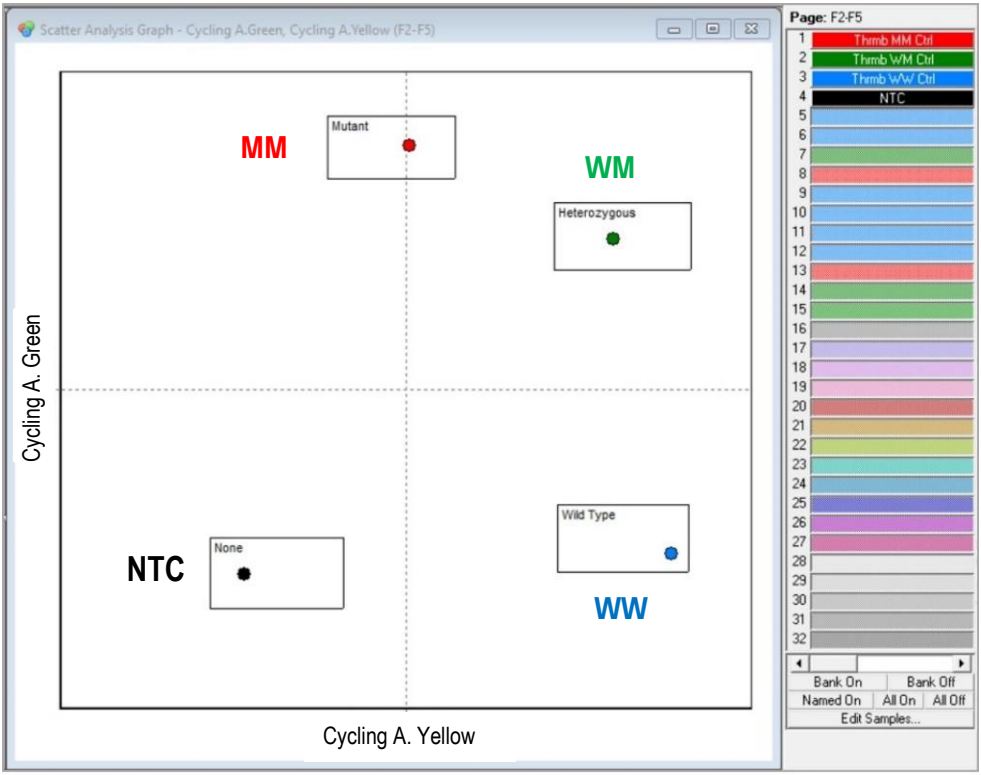
به طور خلاصه از منوی Analysis گزینه other و سپس Scatter Graph Analysis را انتخاب کنید. سپس با استفاده از دکمه Ctrl دو کانال Green و Yellow را انتخاب کرده و بر روی گزینه Show کلیک کنید. در پنجره باز شده صفحه مربوط به میکس F2-F5 را انتخاب نمایید.

توجه داشته باشید که تشخیص ژنوتایپ نمونه ها با این روش 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 تابش فلورسانس سبز و وجود آلل Mutant یا M را نشان می‌دهد. محور افقی بیانگر میزان تابش فلورسانس زرد و به آلل طبیعی Wild type یا W اختصاص دارد.

تابش سبز برای نمونه‌های 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 نمونه‌های هتروزیگوت یا WM تابش سبز/Green و زرد/Yellow 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 (شکل ۱)

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 تا مطابق شکل ۱ ژنوتایپ هر یک از شاهدها نمایان شود. سپس نمونه های بیماران نیز روشن شود و ژنوتایپ هریک را تعیین نمایید.



شکل ۱. فاکتور۵ - نمایش چگونگی پراکندگی کنترل‌ها با میکس F2-F5 درنمودار نقطه ای

آنالیز نمودار پراکندگی جهت بررسی فاکتور ۲:

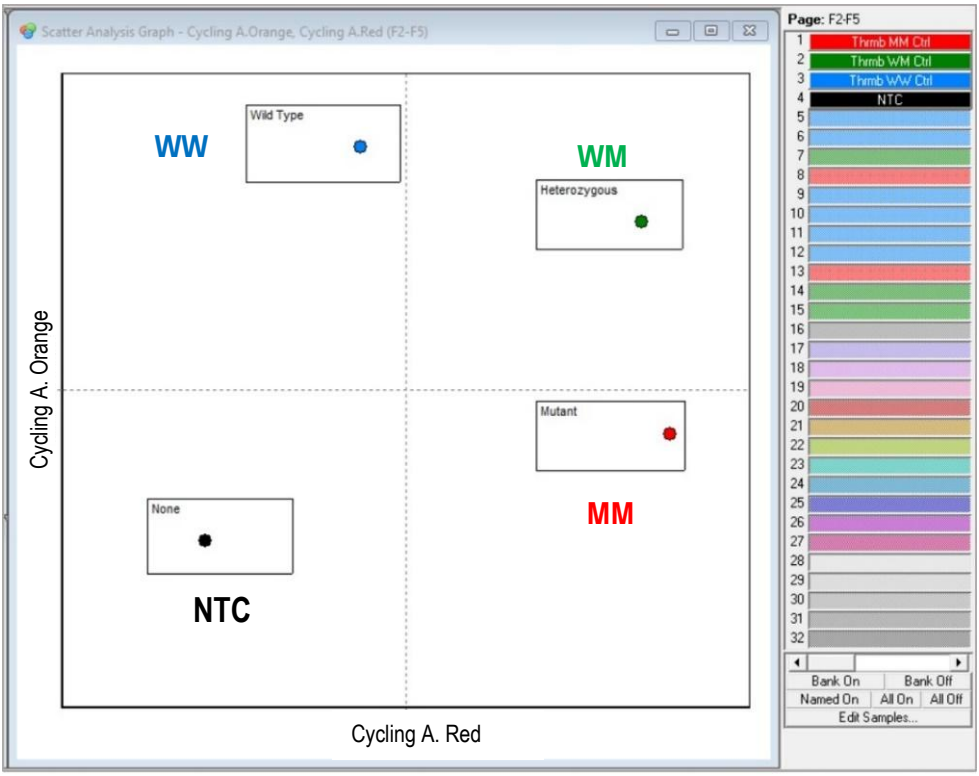
به طور خلاصه از منوی Analysis گزینه other و سپس Scatter Graph Analysis را انتخاب کنید. سپس با استفاده از دکمه Ctrl دو کانال Red و Orange را انتخاب کرده و بر روی گزینه Show کلیک کنید. در پنجره باز شده صفحه مربوط به میکس F2-F5 را انتخاب نمایید.

توجه داشته باشید که تشخیص ژنوتایپ نمونه ها با این روش 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 نمونه‌ها می‌باشد. محور عمودی میزان تابش فلورسانس نارنجی/Orange به آلل طبیعی Wild type یا W اختصاص دارد. محور افقی نمایانگر میزان تابش فلورسانس قرمز/Red و آلل Mutant یا M را نشان می‌دهد. تابش قرمز برای نمونه‌های هموزیگوت Mutant یا MM چند برابر تابش نارنجی می‌باشد و این نمونه ها در ناحیه راست و پایین نمودار یا جنوب شرقی تجمع پیدا می‌کنند. در مقابل، تابش نارنجی برای نمونه های سالم یا WW چند برابر تابش قرمز است و این نمونه ها در سمت چپ و بالای نمودار یا شمال غربی مشاهده خواهند شد. در نمونه های هتروزیگوت یا WM تابش قرمز و نارنجی 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 قرمز و نارنجی اندکی بوده و این نمونه ها در ناحیه سمت چپ پایین نمودار یا جنوب غربی دیده می‌شوند (شکل۲)

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 تا مطابق شکل ۲ ژنوتایپ هر یک از شاهدها نمایان شود. سپس نمونه های بیماران نیز روشن شود و ژنوتایپ هریک را تعیین نمایید.



شکل ۲. فاکتور۲- نمایش چگونگی پراکندگی کنترل‌ها با میکس F2-F5 درنمودار نقطه ای

آنالیز نمودار پراکندگی جهت بررسی MTHFR A1298C:

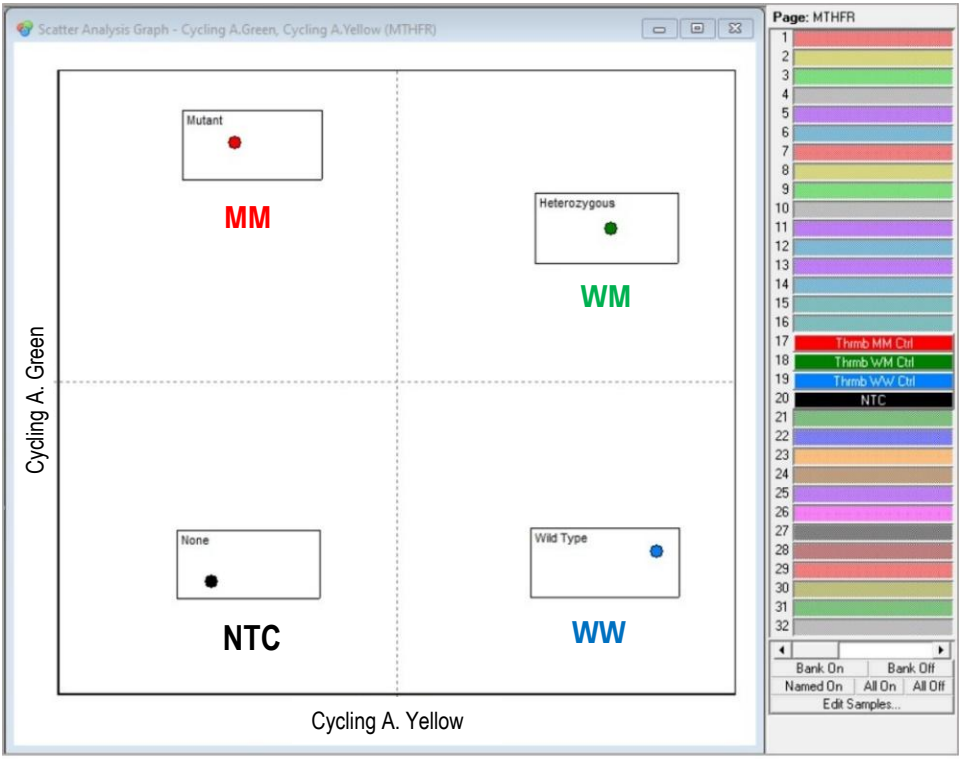
به طور خلاصه از منوی Analysis گزینه other و سپس Scatter Graph Analysis را انتخاب کنید. سپس با استفاده از دکمه Ctrl دو کانال Green و Yellow را انتخاب کرده و بر روی گزینه Show کلیک کنید. در پنجره باز شده صفحه مربوط به میکس MTHFR را انتخاب نمایید.

توجه داشته باشید که تشخیص ژنوتایپ نمونه ها با این روش 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. در بررسی جهش MTHFR A1298C محور عمودی میزان تابش فلورسانس سبز/Green و آلل Mutant یا M را نشان میدهد و محور افقی بیانگر میزان تابش فلورسانس زرد/Yellow و حضور آلل طبیعی Wild type یا W می‌باشد.

تابش سبز برای نمونه‌های 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 (شکل ۳)

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 تا مطابق شکل ۳ ژنوتایپ هر یک از شاهدها نمایان شود.



شکل ۳. MTHFR A1298C- نمایش چگونگی پراکندگی کنترل‌ها با میکس MTHFR در نمودار نقطه ای

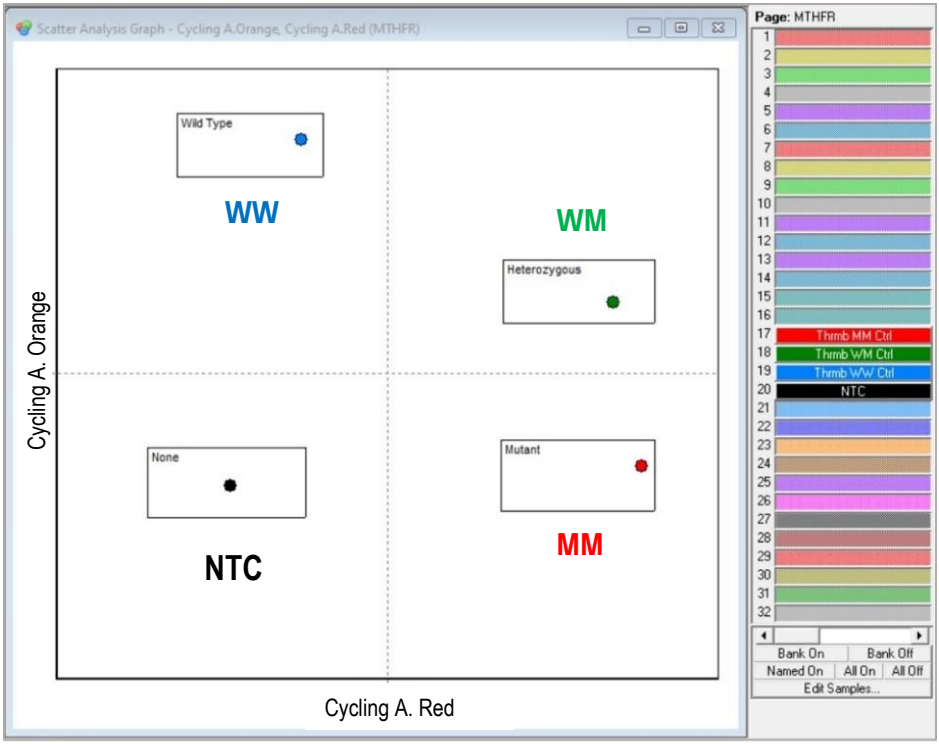
آنالیز نمودار پراکندگی جهت بررسی MTHFR C677T:

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 Red و Orange را انتخاب کرده و بر روی گزینه Show کلیک کنید. در پنجره باز شده صفحه مربوط به میکس MTHFR را انتخاب نمایید.

توجه داشته باشید که تشخیص ژنوتایپ نمونه ها به این روش 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 تابش فلورسانس نارنجی/Orange و به آلل طبیعی Wild type یا W اختصاص دارد. محور افقی میزان تابش فلورسانس قرمز/Red و حضور آلل Mutant یا M را نشان می‌دهد. تابش قرمز برای نمونه‌های هموزیگوت Mutant یا MM چند برابر تابش نارنجی می‌باشد و این نمونه ها در ناحیه راست و پایین نمودار یا جنوب شرقی تجمع پیدا می‌کنند. در مقابل، تابش نارنجی برای نمونه های سالم یا WW چند برابر تابش قرمز است و این نمونه ها در سمت چپ و بالای نمودار یا شمال غربی مشاهده خواهند شد. در نمونه های هتروزیگوت یا WM تابش قرمز و نارنجی 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 قرمز و نارنجی اندکی بوده و این نمونه ها در ناحیه سمت چپ پایین نمودار یا جنوب غربی دیده می‌شوند (شکل ۴)

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 تا مطابق شکل ۴ ژنوتایپ هر یک از شاهدها نمایان شود. سپس نمونه های بیماران نیز روشن شود و ژنوتایپ هریک را تعیین نمایید.



شکل ۴. MTHFR C677T - نمایش چگونگی پراکندگی کنترل ها با میکس MTHFR درنمودار نقطه ای

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!

ب) آنالیز نتایج با بررسی فلورسانس نهایی (Endpoint)

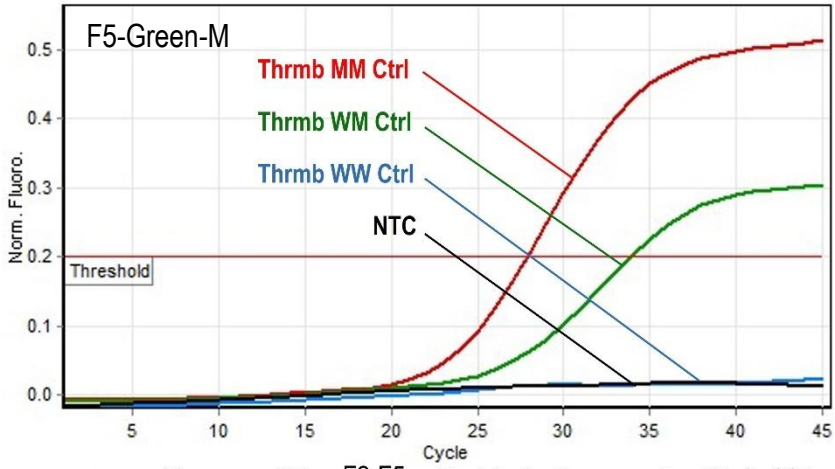
جهت بررسی نتایج هر یک از فاکتورهای ژنتیکی باید نمودار نمونه مورد نظر را با میکس مربوطه در دو کانال متعلق به آلل سالم و جهش یافته بررسی نمود. در جدول زیر به طور خلاصه مشخص شده است که چهار کانال مورد بررسی برای هر میکس مربوط به آلل های کدام فاکتور ژنتیکی می‌باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می‌شود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت معتبر بوده و قابل تفسیر می‌باشد.

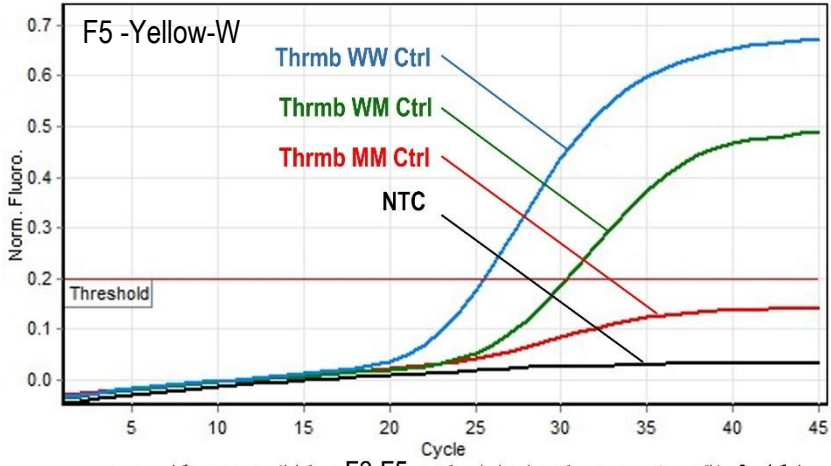
Mix/Channel	Green/FAM	Yellow/HEX	Red/Cy5	Orange/ROX
F2-F5 Mix	F5 Mutant	F5 Wild type	F2 Mutant	F2 Wild type
MTHFR	1298 Mutant	1298 Wild type	677 Mutant	677 Wild type

آنالیز میزان فلورسانس نهایی جهت بررسی فاکتور۵:

به طور خلاصه از منوی Analysis، گزینه Quantitation را انتخاب کرده و در زیر مجموعه Green گزینه F2-F5 را انتخاب کنید. آستانه را روی ۰/۲ قرار دهید. تابش حاصل در کانال سبز مربوط به الل Mutant یا M فاکتور ۵ است. جهت مشاهده نمودار کانال Yellow، نیز مجددا از منوی Analysis، گزینه Quantitation را انتخاب کرده و در زیر مجموعه Yellow گزینه F2-F5 را انتخاب کنید. آستانه را روی ۰/۲ قرار دهید. تابش حاصل در کانال زرد مربوط به آلل سالم یا Wild برای فاکتور ۵ است. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهدها با میکس F2-F5 در کانال سبز و زرد، تصاویر ۵ و۶ ملاحظه فرمایید.



شکل ۵. فاکتور۵ - منحنی کنترل‌ها با میکس F2-F5 در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل ۶. فاکتور۵- منحنی کنترل‌ها با میکس F2-F5 در کانال زرد دستگاه روتورژن

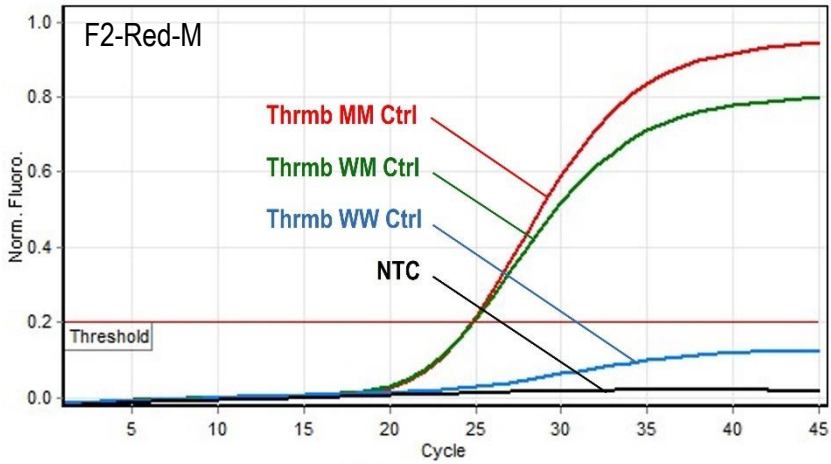
نتایج را می‌توان این چنین تفسیر کرد:

- در صورتی که نمونه در کانال **سبز** با میکس F2-F5 مثبت باشد، و در کانال **زرد** منفی باشد، نمونه از نظر جهش Factor V Leiden **مثبت و هوموزیگوت Mutant** یا **MM** می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در هر دو کانال **سبز** و **زرد** با میکس F2-F5 مثبت باشد،نمونه از نظر جهش Factor V Leiden **هتروزیگوت** یا **WM** می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در کانال **زرد** با میکس F2-F5 مثبت باشد، و در کانال **سبز** منفی باشد، نمونه از نظر جهش Factor V Leiden **منفی و هوموزیگوت سالم** یا **WW** می‌باشد.
- در صورتی که نمونه، حداقل در یکی از کانال ها مثبت نشود نتیجه نامعتبر بوده و آزمایش باید **تکرار** شود. استخراج نامناسب یا خطا در تنظیم آزمایش می‌تواند دلیل چنین نتیجه ای باشد.

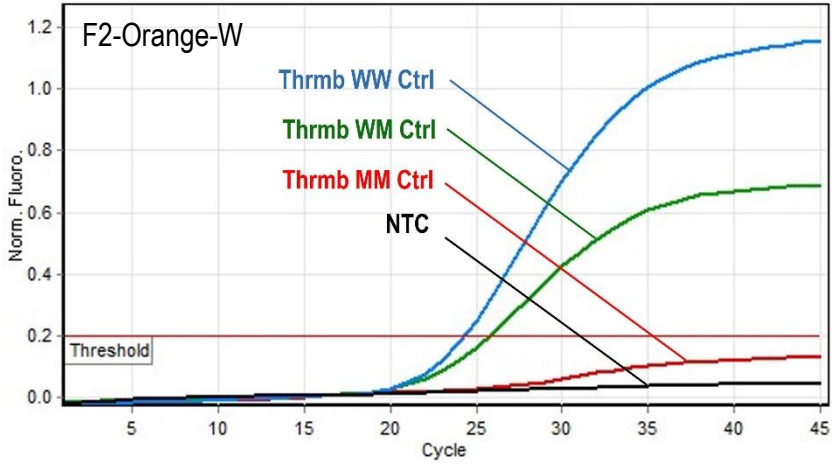
به طور خلاصه نتایج را مطابق جدول صفحه ۱۱ تفسیر نمایید.

آنالیز میزان فلورسانس نهایی جهت بررسی فاکتور۲:

به طور خلاصه از منوی Analysis، گزینه Quantitation را انتخاب کرده و در زیر مجموعه Red گزینه F2-F5 را انتخاب کنید. آستانه را روی ۰/۲ قرار دهید. تابش حاصل در کانال قرمز/Red مربوط به الل Mutant یا M فاکتور ۲ است. جهت مشاهده نمودار کانال Orange، مجددا از منوی Analysis، گزینه Quantitation را انتخاب کرده و در زیر مجموعه Orange گزینه F2-F5 را انتخاب کنید. آستانه را روی ۰/۲ قرار دهید. تابش حاصل در کانال نارنجی/Orange مربوط به آلل سالم یا Wild برای فاکتور ۲ است. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهدها با میکس F2-F5 در کانال قرمز و نارنجی، تصاویر ۷ و ۸ را ملاحظه فرمایید.



شکل ۷. فاکتور۲- منحنی کنترل‌ها با میکس F2-F5 در کانال قرمز دستگاه روتورژن



شکل ۸. فاکتور۲- منحنی کنترل‌ها با میکس F2-F5 در کانال نارنجی دستگاه روتورژن

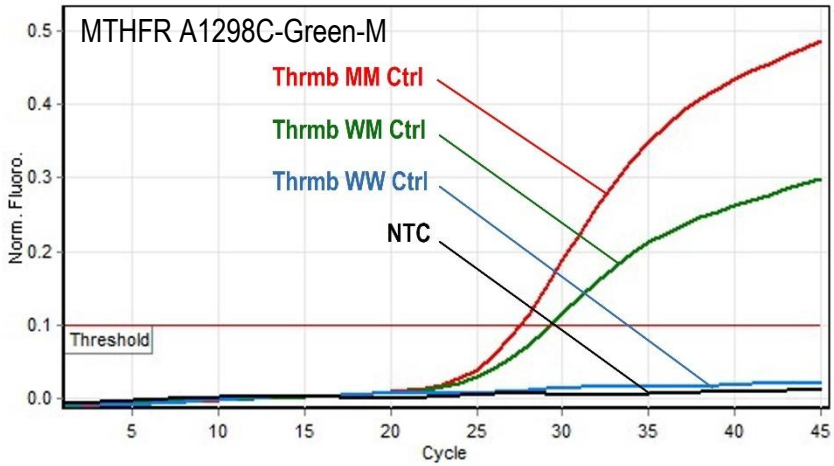
نتایج را می‌توان این چنین تفسیر کرد:

- در صورتی که نمونه در کانال **قرمز** با میکس F2-F5 مثبت باشد، و در کانال **نارنجی** منفی باشد، نمونه از نظر جهش Factor II **مثبت و هوموزیگوت Mutant** یا **MM** می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در هر دو کانال **قرمز** و **نارنجی** با میکس F2-F5 مثبت باشد نمونه از نظر جهش Factor II **هتروزیگوت** یا **WM** می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در کانال **نارنجی** با میکس F2-F5 مثبت باشد، و در کانال **قرمز** منفی باشد، نمونه از نظر جهش Factor II **منفی و هوموزیگوت سالم** یا **WW** می‌باشد.
- در صورتی که نمونه، حداقل در یکی از کانال ها مثبت نشود نتیجه نامعتبر بوده و آزمایش باید **تکرار** شود. استخراج نامناسب یا خطا در تنظیم آزمایش می‌تواند دلیل چنین نتیجه ای باشد.

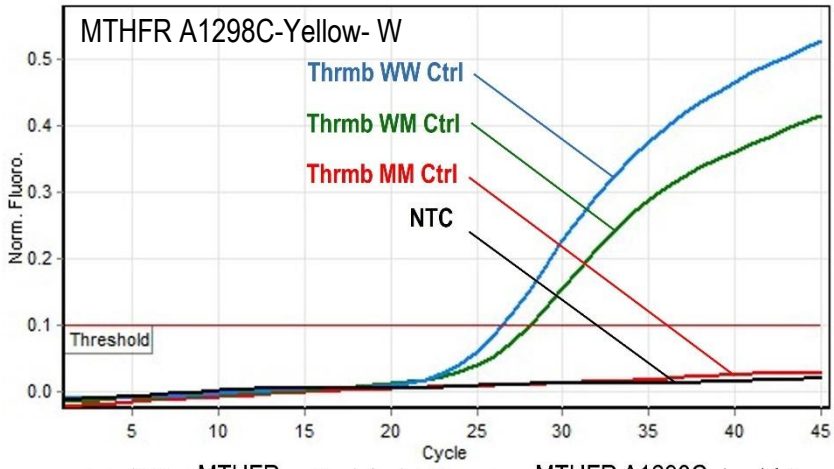
به طور خلاصه نتایج را مطابق جدول صفحه ۱۱ تفسیر نمایید.

آنالیز میزان فلورسانس نهایی جهت بررسی MTHFR A1298C:

به طور خلاصه از منوی Analysis، گزینه Quantitation را انتخاب کرده و در زیر مجموعه Green گزینه MTHFR را انتخاب کنید. آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. تابش حاصل در کانال سبز مربوط به الل Mutant یا M برای MTHFR A1298C است. جهت مشاهده نمودار کانال Yellow، نیز مجددا از منوی Analysis، گزینه Quantitation را انتخاب کرده و در زیر مجموعه Yellow گزینه MTHFR را انتخاب کنید. آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. تابش حاصل در کانال زرد مربوط به آلل سالم یا Wild برای MTHFR A1298C است. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهدها با میکس F2-F5 در کانال سبز و زرد، تصاویر ۹ و ۱۰ ملاحظه فرمایید.



شکل ۹. MTHFR A1298C- منحنی کنترل‌ها با میکس MTHFR در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل ۱۰. MTHFR A1298C - منحنی کنترل‌ها با میکس MTHFR در کانال زرد دستگاه روتورژن

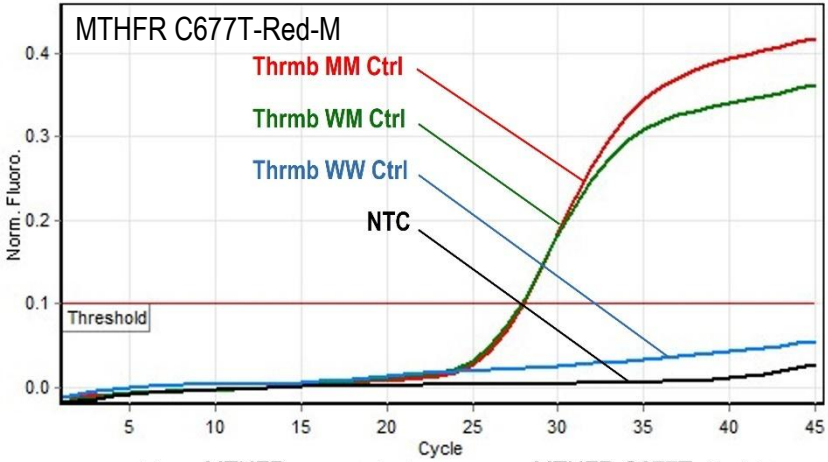
نتایج را می‌توان این چنین تفسیر کرد:

- در صورتی که نمونه در کانال **سبز** با میکس MTHFR مثبت باشد، و در کانال **زرد** منفی باشد، نمونه از نظر جهش MTHFR A1298C **مثبت و هوموزیگوت Mutant** یا **MM** می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در هر دو کانال **سبز** و **زرد** با میکس F2-F5 مثبت باشد نمونه از نظر جهش MTHFR A1298C **هتروزیگوت** یا **WM** می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در کانال **زرد** با میکس F2-F5 مثبت باشد، و در کانال **سبز** منفی باشد، نمونه از نظر جهش MTHFR A1298C **منفی و هوموزیگوت سالم** یا **WW** می‌باشد.
- در صورتی که نمونه، حداقل در یکی از کانال ها مثبت نشود نتیجه نامعتبر بوده و آزمایش باید **تکرار** شود. استخراج نامناسب یا خطا در تنظیم آزمایش می‌تواند دلیل چنین نتیجه ای باشد.

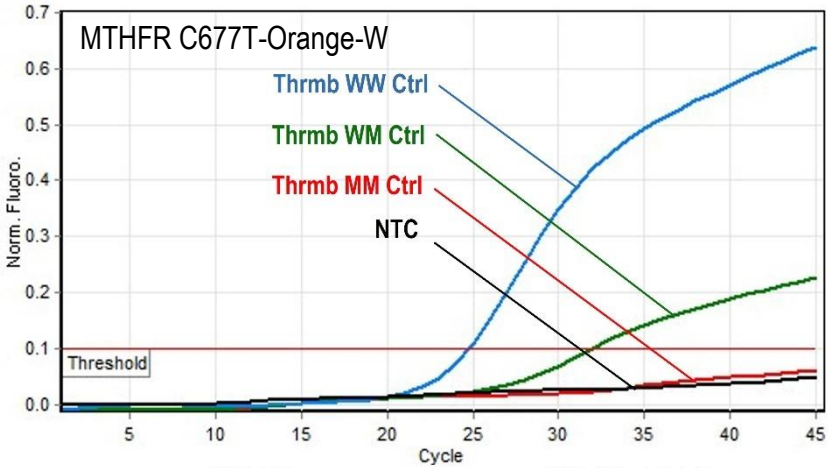
به طور خلاصه نتایج را مطابق جدول صفحه ۱۱ تفسیر نمایید.

آنالیز میزان فلورسانس نهایی جهت بررسی MTHFR C677T:

به طور خلاصه از منوی Analysis، گزینه Quantitation را انتخاب کرده و در زیر مجموعه Red گزینه MTHFR را انتخاب کنید. آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. تابش حاصل در کانال قرمز مربوط به الل Mutant یا M برای MTHFR C677T است. جهت مشاهده نمودار کانال Orange، مجددا از منوی Analysis، گزینه Quantitation را انتخاب کرده و در زیر مجموعه Orange گزینه MTHFR را انتخاب کنید. آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. تابش حاصل در کانال نارنجی مربوط به آلل سالم یا Wild برای MTHFR C677T است. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهدها با میکس MTHFR در کانال قرمز و نارنجی، تصاویر ۱۱ و ۱۲ را ملاحظه فرمایید.



شکل ۱۱. MTHFR C677T- منحنی کنترل‌ها با میکس MTHFR در کانال قرمز دستگاه روتورژن



شکل ۱۲. MTHFR C677T - منحنی کنترل‌ها با میکس MTHFR در کانال نارنجی دستگاه روتورژن

نتایج را می‌توان این چنین تفسیر کرد:

- در صورتی که نمونه در کانال **قرمز** با میکس MTHFR مثبت باشد، و در کانال **نارنجی** منفی باشد، نمونه از نظر جهش MTHFR C677T **مثبت و هوموزیگوت Mutant** یا **MM** می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در هر دو کانال **قرمز** و **نارنجی** با میکس MTHFR مثبت باشد نمونه از نظر جهش MTHFR C677T **هتروزیگوت** یا **WM** می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در کانال **نارنجی** با میکس MTHFR مثبت باشد و در کانال **قرمز** منفی باشد، نمونه از نظر جهش MTHFR C677T **منفی و هوموزیگوت سالم** یا **WW** می‌باشد.
- در صورتی که نمونه، حداقل در یکی از کانال ها مثبت نشود نتیجه نامعتبر بوده و آزمایش باید **تکرار** شود. استخراج نامناسب یا خطا در تنظیم آزمایش می‌تواند دلیل چنین نتیجه ای باشد.

به طور خلاصه نتایج را مطابق جدول شماره ۱ در صفحه ۱۱ تفسیر نمایید.

۲۰. 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.

۲۱. پشتیبانی فنی

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

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱
Info@novingene.com

۲۲. 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

۲۳. منابع

- Andrea Luigi Tranquilli., 2011. *Thrombophilia*. Rijeka: Intech.
- Christiansen, S.C., Cannegieter, S.C., Koster, T., Vandenbroucke, J.P. and Rosendaal, F.R., 2005. Thrombophilia, clinical factors, and recurrent venous thrombotic events. *Jama*, *293*(19), pp.2352-2361.
- Khan, S. and Dickerman, J.D., 2006. Hereditary thrombophilia. *Thrombosis journal*, *4*(1), pp.1-17.
- Mackay, Ian M. "Real-time PCR in the microbiology laboratory." Clinical microbiology and infection 10, no. 3., 2004: 190-212.

۲۴. 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.

Thrombo4X
Kit Manual

Autumn 2025, Version 1.1

For Real-Time PCR Detection of Factor II, Factor V Leiden, MTHFR C677T and MTHFR A1298C mutations
For use with Rotor-Gene
For Research Use Only

24 (Cat#T4X24)
48 (Cat#T4X48)
96 (Cat#T4X96)
NG-WI-ASL-60-100

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 4
5. Kit Contents 5
6. Packaging models 5
7. Storage and Stability 5
8. Product Use Limitations 5
9. Additionally Required Materials 6
10. General Precautions 6
11. Specimen, Storage and Transport 7
12. InterferingSubstances 7
13. Internal Control 7
14. DNA Isolation 7
15. PCR Protocol 8
16. Devices and software 8
17. Programming Rotor-Gene 8
18. Programming Other Machines 10
19. Data Analysis: Rotor-Gene 10
20. Disposal Method 28

21. Technical Support 28
22. Contact Information 28
23. References 29
24. Symbols 29

1. Introduction

Thrombo4X kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting Factor II (G2021A), Factor V Leiden (G1691A), MTHFR (C677T) and MTHFR (A1298C). All required reagents are included in the PCR Mix provided in the kit.
This kit is intended for Research Use Only!

2. Intended Use

Thrombo4X kit is intended for the detection of Factor II (G2021A), Factor V Leiden (G1691A), MTHFR (C677T) and MTHFR (A1298C) mutations in human DNA. Detection is achieved using Real-Time PCR and is compatible with Rotor-Gene and MIC machine.

3. Background Information

Thrombophilia (hypercoagulability) is an acquired or inherited disorder in which abnormality in blood coagulation increases the risk of thrombosis. Several point mutations are known to play role in thrombophilia including Factor II (Prothrombin), Factor V, Factor VIII, MTHFR, Fibrinogen, Plasminogen, Antithrombin III, Protein S and Protein C.
Factor V Leiden is an autosomal dominant inherited disorder of blood clotting and refers to specific G1691A substitution in Factor V gene (R506Q). About 3 to 8 percent of Caucasian population and 20 percent of patients with Venous thromboembolism (VTE) carry one copy of this mutation (heterozygous) and about 1 in 5000 and 0.1 percent of patients with VTE carry two copies of it (homozygous). Heterozygosity for factor V Leiden is associated with 7-fold increased risk of venous thromboembolism (VTE)

including deep venous thrombosis (DVT) and pulmonary embolism. The risk of VTE is increased 80 fold in Factor V Leiden homozygous. Factor V Leiden is also associated with a 2 to 3 fold increase in relative risk of pregnancy loss.
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.
MTHFR stands for Methylenetetrahydrofolate reductase which is a key regulatory enzyme in folate and homocysteine metabolism. Since, the C677T and A1298C variants show reduced activity (30-65% and 15-30% reduction respectively), these polymorphisms are among the most important genetic determinants of plasma total homocysteine.
Depending on the ethnic background up to 50% of population may carry the variant allele of MTHFR.

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-F5 Mix	PCR Mix* for Factor 2 and Factor 5	480 µl
MTHFR Mix	PCR Mix* for MTHFR A1298C and MTHFR C677T	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 computer accessory
- 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 and peripheral blood (0.5ml) are the preferred samples. 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 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

This kit detects four mutations in Factor II, Factor V and MTHFR gene. 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 ice completely, followed by a brief mixing and a quick spin. Place the required number of tubes on a cold block. This kit includes two mixes, **F2-F5 Mix** which detects Factor V and Factor II alleles and **MTHFR Mix** which detects MTHFR A1298C and MTHFR C677T. Each sample should be examined with both F2-F5 Mix and MTHFR Mix in two separate set of reactions. In each set, consider 1 tube for each sample plus four tubes for controls and NTC.

Pipette 20µl of F2-F5 Mix to the first series of tubes and 20ul of MTHFR Mix to each tube of second series followed by adding 5ul of controls or sample DNA and NTC.

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

Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring.

16. Devices and software

Thrombo4X RQ kit is designed to work with Rotor-Gene and MIC.

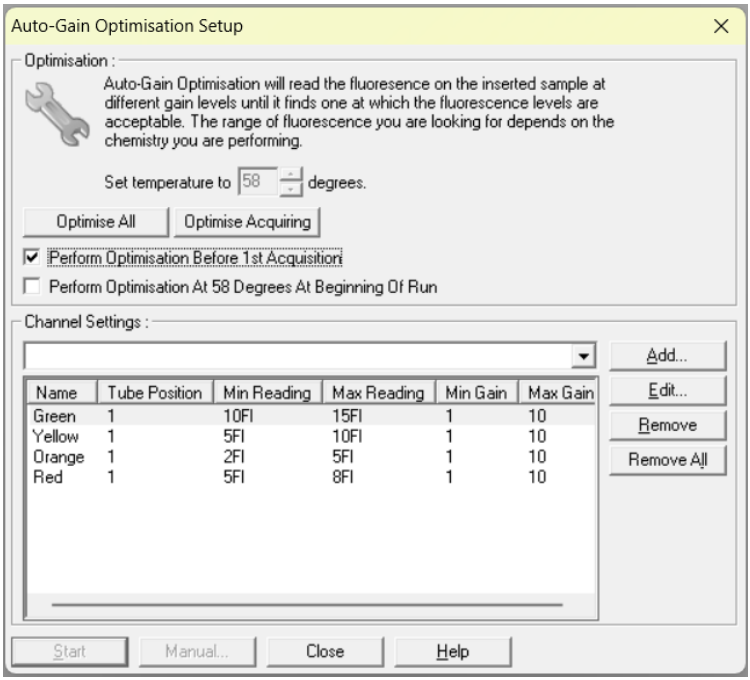
17. Programming Rotor-Gene

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

Open the Thrombo4X template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); Thrombo4X 0.1 is

for strip tubes and Thrombo4X 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. 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.

18. 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
	57°C x 30 sec	

Fluorescence should be collected at 57°C for FAM, VIC, Rox and Cy5 dyes.

Please note that, Mixes does not contain ROX dye as normalizer!

19. Data Analysis: Rotor-Gene

Results are analyzed based on presence or absence of reaction in each channel with each mix.

Briefly with F2-F5 mix, Factor V Leiden wild type allele will have a reaction in VIC channel and the mutant allele in FAM channel. With the same mix, Factor II wild type allele will have a reaction in ROX channel and the mutant allele in CY5 channel.

Similar to the above, with MTHFR mix, MTHFR1298 wild type allele will show a reaction in VIC channel and the mutant allele in FAM channel. With the same mix, MTHFR677 wild type allele will show cross reaction in ROX channel and the mutant allele in CY5 channel. Results are summarized in the following table.

Mix	Target	FAM	VIC	CY5	ROX	Results
F2-F5 Mix	F5	+	-			F5 MM
		+	+			F5 WM
		-	+			F5 WW

	F2			+	-	F2 MM
				+	+	F2 WM
				-	+	F2 WW
MTHFR Mix	1298	+	-			1298 MM
		+	+			1298 WM
		-	+			1298 WW
	677			+	-	677 MM
				+	+	677 WM
				-	+	677 WW
		-	-	-	-	NTC

Based on above point, two methods can be used for data analysis which will be described afterwards.

A) Analysis with scatter graph

B) Analysis with endpoint fluorescence

A) Analysis with scatter graph

To analyze the results with scatter graph for Factor V:

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” and select F2-F5.

Please note that the genotyping of the samples can only be determined if all three controls of the kits were used in the experiment.

The “Scatter Graph Window” is now shown. Each dot represents one sample. The vertical axis shows the Green fluorescence and belongs to M allele and horizontal axis is for the Yellow fluorescence represent W allele.

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 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 Neg Control as “None” (Fig 1). Then turn on patient’s sample and determine its genotype.

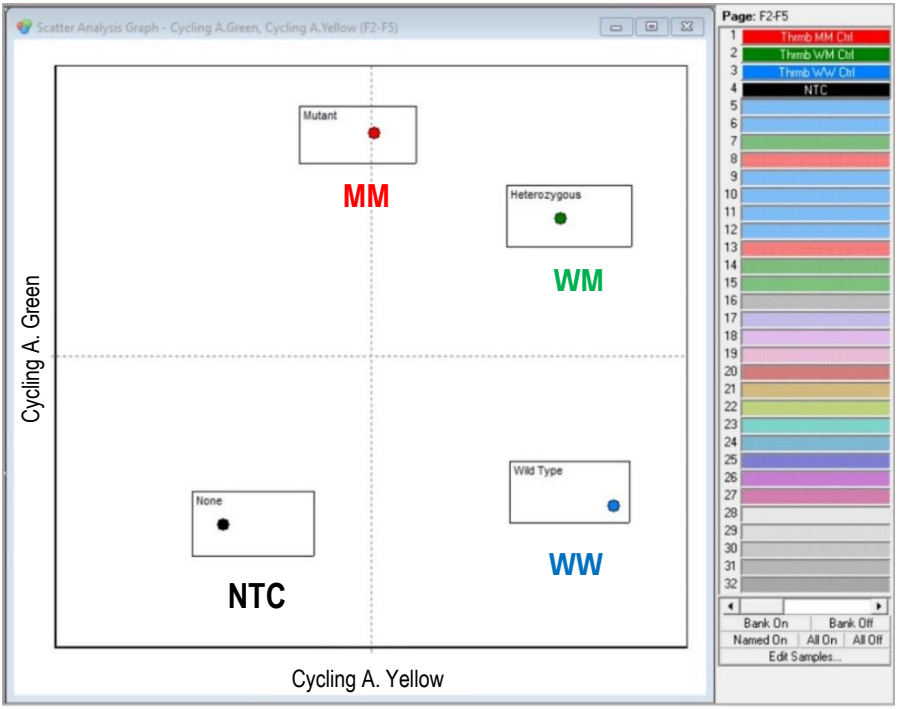


Fig 1. Factor V Leiden-Typical scatter graph for Controls with F2-F5 Mix for Rotor-Gene

A) <u>To analyze the results with scatter graph for Factor II:</u>

Briefly, click on Analysis menu select “Other” and then “Scatter Graph Analysis”. Using Ctrl button, mark both Red and Orange channels and then click on “Show” and select F2-F5.

<u>Please note that the genotyping of the samples can only be determined if all three controls of the kits were used in the experiment.</u>

The “Scatter Graph Window” is now shown. Each dot represents one sample. The vertical axis shows the Orange fluorescence

and belongs to W allele and horizontal axis is for the Red fluorescence and M allele.

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

In order to determine genotypes of the samples, the 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 2). Then, turn on patient's sample and determine its genotype.

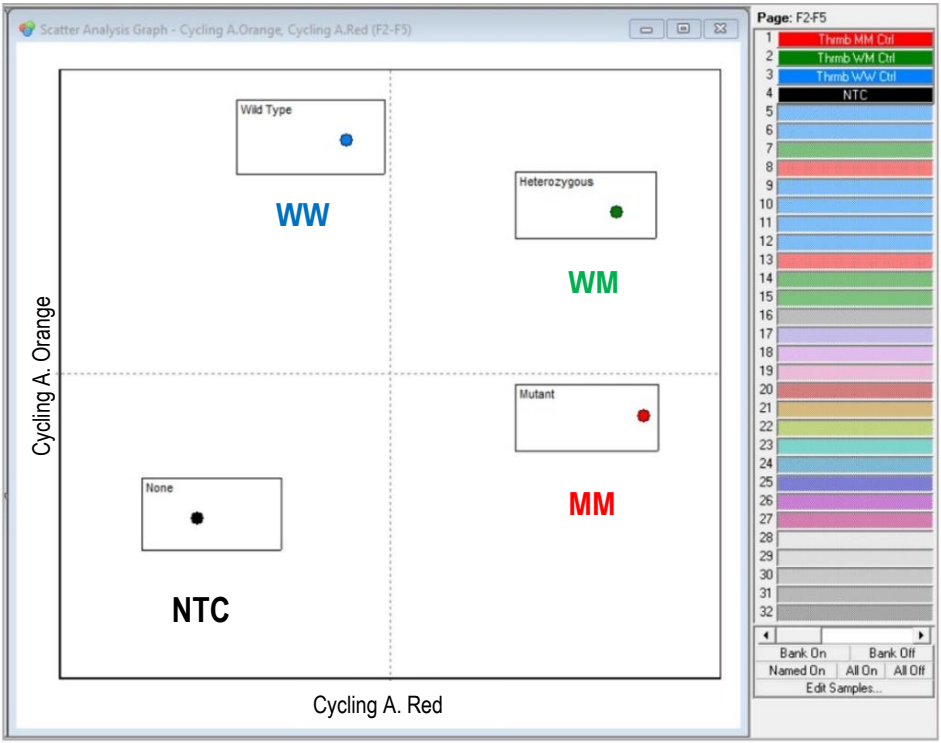


Fig 2. Factor II-Typical scatter graph for Controls with F2-F5 Mix For Rotor-Gene

<u>To analyze the results with scatter graph for MTHFR A1298C:</u>

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” and select MTHFR.

<u>Please note that the genotyping of the samples can only be determined if all three controls of the kits were used in the experiment.</u>

The “Scatter Graph Window” is now shown. Each dot represents one sample. The vertical axis shows the Green fluorescence and

M allele. horizontal axis is for the Yellow fluorescence and W allele.

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 3). Then, turn on patient's sample and determine its genotype.

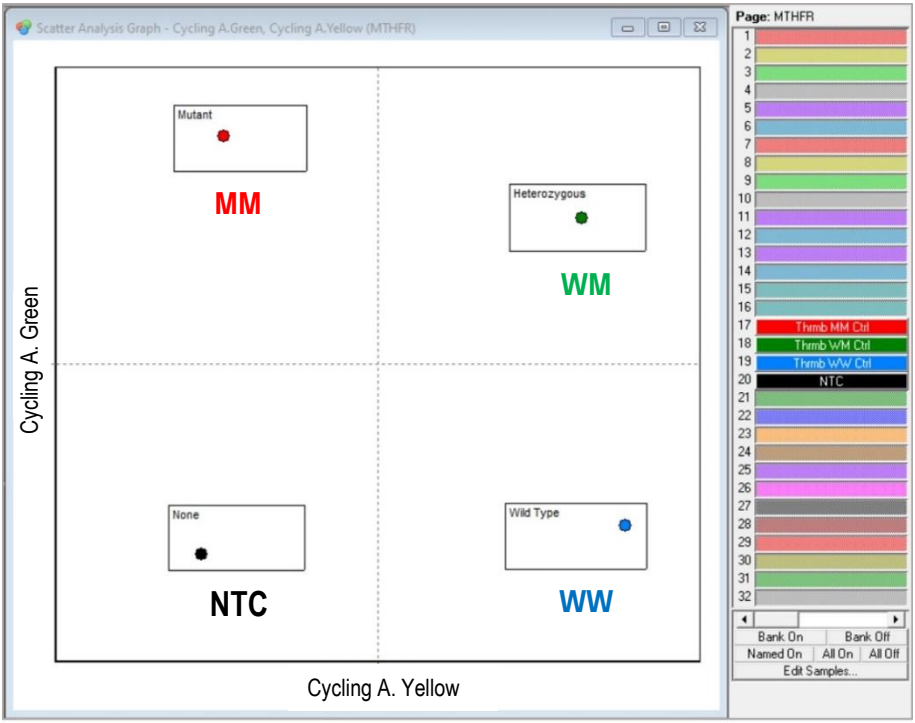


Fig 3. MTHFR A1298C-Typical scatter graph for Controls with MTHFR Mix in Rotor-Gene

A) <u>To analyze the results with scatter graph for MTHFR C677T:</u>

Briefly, click on Analysis menu select "Other" and then "Scatter Graph Analysis". Using Ctrl button, mark both Red and Orange channels and then click on "Show" and select MTHFR.

Please note that the genotyping of the samples can only be determined if all three controls of the kits were used in the experiment.

The "Scatter Graph Window" is now shown. Each dot represents one sample. The vertical axis shows the Orange fluorescence

and W allele. horizontal axis is for the Red fluorescence and belong to M allele. Note that M allele is detected in Red channel and W allele in Orange channel for MTHFR C677T.

Therefore, samples are located in four regions of the graph. MM samples with high Red and low Orange fluorescence gather in lower right; WW samples with low Red fluorescence and high Orange gather in upper left; WM samples with high Red and high Orange fluorescence gather in upper right; and finally NTC or control with no DNA gather in lower left with low Red and low Orange 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 4). Then, turn on patient's sample and determine its genotype.

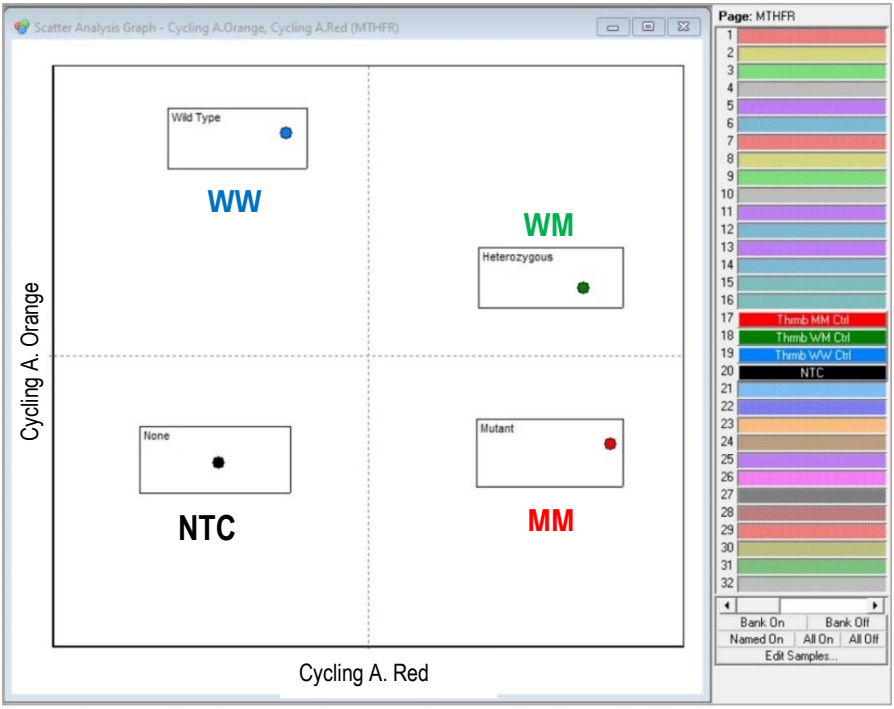


Fig 4. MTHFR C677T-Typical scatter graph for Controls with MTHFR Mix in Rotor-Gene

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!

B) To analyze by the endpoint fluorescence:

To analysis the results of each genetic factor, each sample should be checked with the corresponding mix in two channels belonging to the Wild type and Mutant alleles. It is specified in the

bellow table that the four channels of each mix are related to the alleles of which genetic factors.

Mix/Channel	Green/FAM	Yellow/HEX	Red/Cy5	Orange/ROX
F2-F5 Mix	F5 Mutant	F5 Wild type	F2 Mutant	F2 Wild type
MTHFR	1298 Mutant	1298 Wild type	677 Mutant	677 Wild type

To assess Factor V Leiden with endpoint fluorescence:

To analyze data briefly, click on the Analysis menu and then under the Quantitation tab double-click on Cycling A. Green and F2-F5, manually put threshold at 0.2. the Green signal is due to Mutant or M allele. Repeat the above for the Yellow Channel and F2-F5 and put the threshold at 0.2 which due to wild or W allele. Figures 5 and 6 represent typical graphs for the Rotor-Gene.

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase.

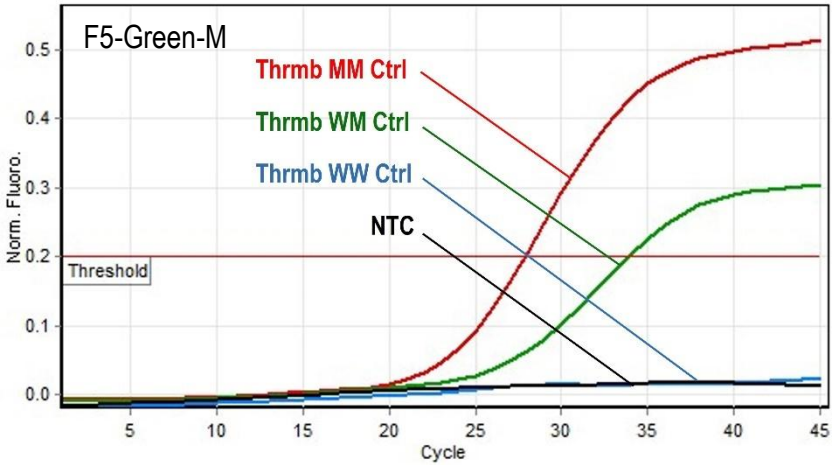


Fig 5. Factor V Leiden-Typical Control graph with F2-F5 Mix in Green channel for Rotor-Gene

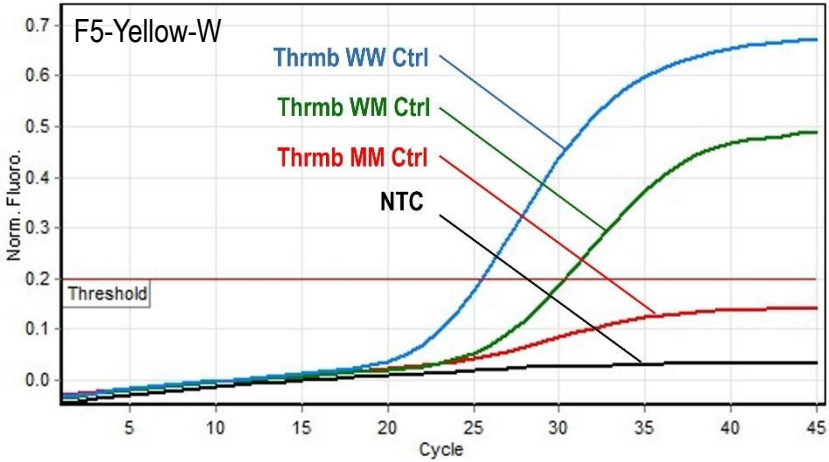


Fig 6. Factor V Leiden-Typical Control graph with F2-F5 Mix in Yellow channel for Rotor-Gene

Consider following points when analysis:

- If a sample is Pos in **Green** channel with F2-F5 Mix, and Negative in **Yellow** channel it is **Homozygote / MM for Factor V Leiden.**
- If a sample is Pos in both **Green** and **Yellow** channel with F2-F5 Mix, sample is **Heterozygote / WM for Factor V Leiden**.
- If a sample is Pos in **Yellow** and Negative in **Green** channel with F2-F5 Mix, sample is **Homozygote Wild type or WW.**
- If a sample is negative for both alleles, then results are **inconclusive,** and the test should be repeated. Improper extraction could cause that.

The interpretation of the results is summarized in the table of page 9.

To assess Factor II with Quantitation graph:

To analyze data briefly, click on the Analysis menu and then under the Quantitation tab double-click on Cycling A. Red and F2-F5, manually put threshold at 0.2. the Red signal is due to Mutant or M allele. Repeat the above for the Orange Channel and F2-F5 and put the threshold at 0.2. The Orange signal is due to wild or W allele. Figures 7 and 8 represent typical graphs for the Rotor-Gene.

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase.

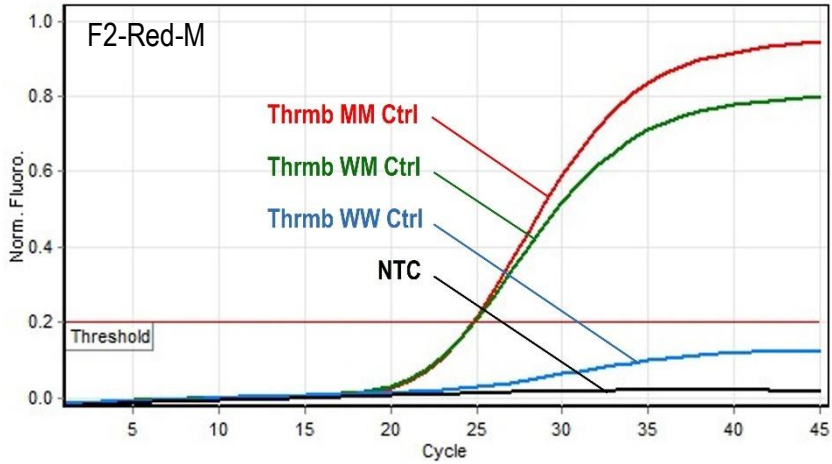


Fig 7. Factor II -Typical Control graph with F2-F5 Mix in Red channel for Rotor-Gene

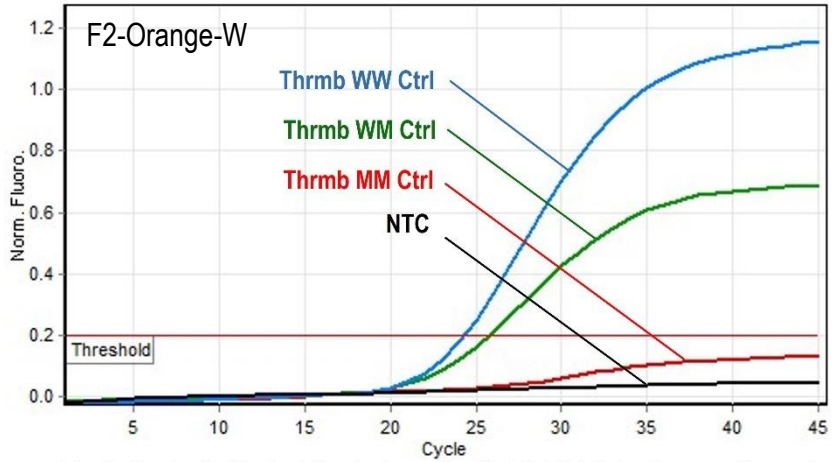


Fig 8. Factor II -Typical Control graph with F2-F5 Mix in Orange channel for Rotor-Gene

- If a sample is Pos in **Red** channel with F2-F5 Mix, and Negative in **Orange** channel it is **Homozygote / MM for Factor II.**
- If a sample is Pos in both **Red** and **Orange** channel with F2-F5 Mix, sample is **Heterozygote / WM for Factor II.**
- If a sample is Pos in **Orange** and Negative in **Red** channel with F2-F5 Mix, sample is **Homozygote Wild type or WW Factor II.**
- If a sample is negative for both alleles, then results are **inconclusive,** and the test should be repeated. Improper extraction could cause that.

The interpretation of the results is summarized in the table of page 9.

To assess MTHFR A1298C with Quantitation graph:

To analyze data briefly, click on the Analysis menu and then under the Quantitation tab double-click on Cycling A. Green and MTHFR, manually put threshold at 0.1. the Green signal is due to Mutant or M allele. Repeat the above for the Yellow Channel and MTHFR and put the threshold at 0.1 which due to wild or W allele. Figures 9 and 10 represent typical graphs for the Rotor-Gene.

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase.

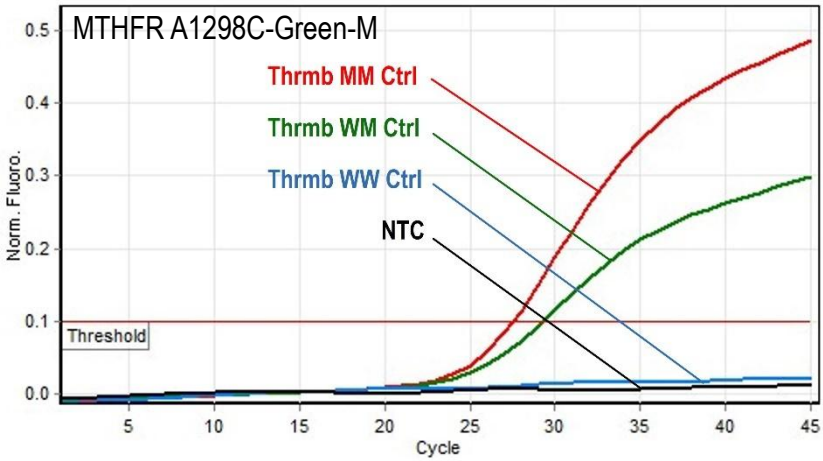


Fig 9. MTHFR A1298C -Typical Control graph with MTHFR Mix in Green channel for Rotor-Gene

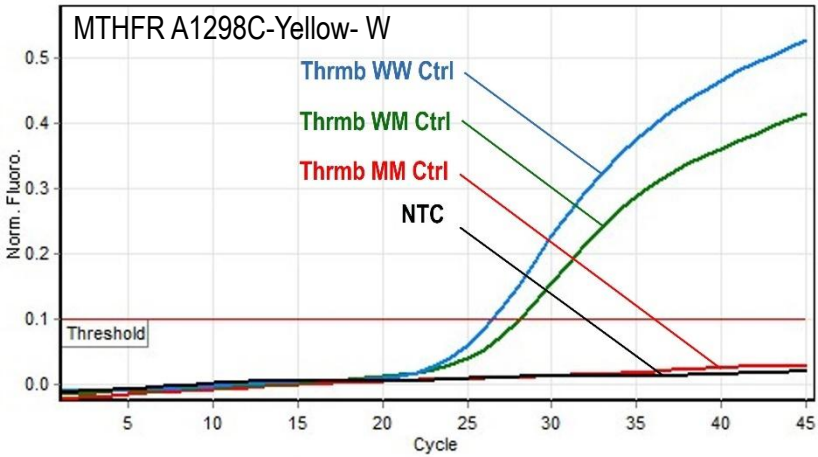


Fig 10. MTHFR A1298C -Typical Control graph with MTHFR Mix in Yellow channel for Rotor-Gene

- If a sample is Pos in **Green** channel with MTHFR Mix, and Negative in **Yellow** channel it is **Homozygote / MM for MTHFR A1298C.**
- If a sample is Pos in both **Green** and **Yellow** channel with MTHFR Mix, sample is **Heterozygote / WM for MTHFR A1298C.**
- If a sample is Pos in **Yellow** and Negative in **Green** channel with MTHFR Mix, sample is **Homozygote Wild type or WW.**
- If a sample is negative for both alleles, then results are **inconclusive,** and the test should be repeated. Improper extraction could cause that.

The interpretation of the results is summarized in the table of page 9.

To assess MTHFR C677T with Quantitation graph:

To analyze data briefly, click on the Analysis menu and then under the Quantitation tab double-click on Cycling A. Red and MTHFR, manually put threshold at 0.1. the Red signal is due to Mutant or M allele. Repeat the above for the Orange Channel and MTHFR and put the threshold at 0.1. The Orange signal is due to wild or W allele. Figures 11 and 12 represent typical graphs for the Rotor-Gene.

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase.

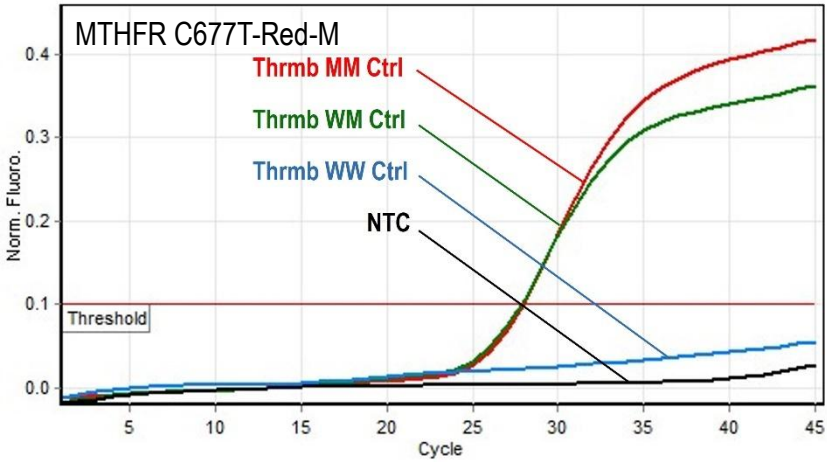


Fig 11. MTHFR C677T -Typical Control graph with MTHFR Mix in Red channel for Rotor-Gene

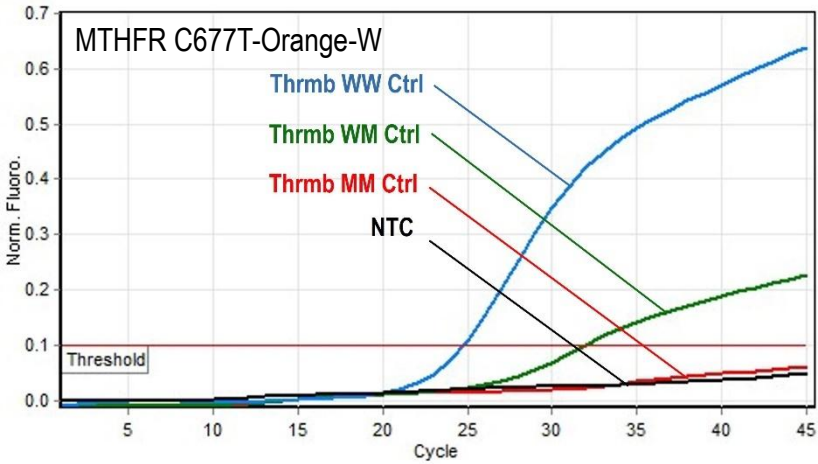


Fig 12. MTHFR C677T - Typical Control graph with MTHFR Mix in Orange channel for Rotor-Gene

- If a sample is Pos in **Red** channel with MTHFR Mix, and Negative in **Orange** channel it is **Homozygote MM for MTHFR C677T.**
- If a sample is Pos in both **Red** and **Orange** channel MTHFR Mix, sample is **Heterozygote WM for MTHFR C677T.**
- If a sample is Pos in **Orange** and Negative in **Red** channel with MTHFR Mix, sample is **Homozygote Wild type or WW.**
- If a sample is negative for both alleles, then results are **inconclusive** and the test should be repeated. Improper extraction could cause that.

The interpretation of the results is summarized in the Table of page 9.

20. Disposal Method

The contents of the kit do not require any special method of disposal and can be directly discarded. But infectious laboratory specimens should be maintained in 5% Sodium Hypochlorite overnight and then discarded.

21. Technical Support

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

22. 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

23. References

- Andrea Luigi Tranquilli, 2011. Thrombophilia. Rijeka: Intech.
- Christiansen, S.C., Cannegieter, S.C., Koster, T., Vandenbroucke, J.P. and Rosendaal, F.R., 2005. Thrombophilia, clinical factors, and recurrent venous thrombotic events. Jama, 293(19), pp.2352-2361.
- Khan, S. and Dickerman, J.D., 2006. Hereditary thrombophilia. Thrombosis journal, 4(1), pp.1-17.
- Mackay, Ian M. "Real-time PCR in the microbiology laboratory." Clinical microbiology and infection 10, no. 3, 2004: 190-212.

24. 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