

راهنمای کیت PAI-1 RQ

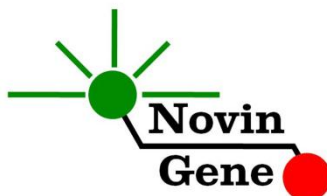
جهت تشخیص پلی مورفیسم PAI-1 4G/5G به روش Real-Time
PCR

جهت کار با دستگاه StepOne و RotorGene
مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-22-102

ویرایش ۱/۲

اسفند ۹۷



فهرست مندرجات:

۱. مقدمه.....	۲
۲. محتویات کیت.....	۳
۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت.....	۳
۴. سایر موارد مورد نیاز.....	۳
۵. نکات قابل توجه.....	۴
۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن.....	۵
۷. عوامل مزاحم.....	۵
۸. کنترل داخلی.....	۵
۹. استخراج DNA.....	۶
۱۰. دستورکار PCR.....	۶
۱۱. تنظیم دستگاه Rotor-Gene.....	۷
۱۲. تنظیم دستگاه StepOne.....	۷
۱۳. تنظیم سایر دستگاه ها.....	۸
۱۴. آنالیز نتایج Rotor-Gene.....	۸
۱۵. آنالیز نتایج StepOne.....	۱۰

کیت PAI-1 RQ جهت تشخیص پلی مورفیسم 4G/5G مربوط به PAI-1 در DNA انسانی می باشد. این کیت مخصوص استفاده تحقیقاتی است و برای کار با دستگاه StepOne یا Rotor-Gene طراحی شده است.

۱. مقدمه

PAI-1 یا Plasminogen Activator Inhibitor 1 یک گلیکوپروتئین با وزن ۵۲ کیلو دالتون میباشد. این پروتئین مهم ترین مهارکننده عوامل فعال کننده پلاسمینوژن میباشد و لذا مهار کننده فیبرینولیز می باشد و از حل شدن لخته خون ممانعت می کند. ژن PAI-1 روی کروموزوم شماره ۷ قرار دارد و شامل ۹ اگزون می باشد. 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 پلی مورفیسم 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 می تواند متصل شوند. اما به آلل 4G فقط عوامل افزایش دهنده نسخه برداری می توانند متصل شوند و بنابراین سبب افزایش بیان ژن PAI-1 می گردد. در حال حاضر آلل 4G را عاملی مستعد کننده برای بیماری های متعدد و متفاوتی در نظر می گیرند که از جمله می توان به موارد زیر اشاره کرد: deep vein thrombosis، آترواسکلروز و سکته قلبی، سقط جنین، سرطان، عفونت های بافتی و همچنین آسم.

کیت PAI-1 RQ برای تشخیص پلی مورفیسم 4G/5G در PAI-1 به روش Real-Time PCR و با استفاده از دستگاه StepOne یا Rotor-Gene طراحی و تولید شده است. در این روش همزمان با پیشرفت واکنش PCR، محصول واکنش با استفاده از پروب های فلورسانت شناسایی می شود. بررسی میزان تغییرات تابش فلورسانت امکان شناسایی توالی هدف را بدون نیاز به مراحل بعدی مانند الکتروفورز فراهم می کند که به نوبه خود امکان آلودگی محیط کار با محصول

PCR را تا حد زیادی کاهش میدهد.

۲. محتویات کیت

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

برچسب	محتوا	حجم
PAI-1 RQ Mix	میکس آماده برای PCR	۴۸۰ میکرولیتر
4G/4G Ctrl	شاهد هموزیگوت 4G/4G	۵۰ میکرولیتر
4G/5G Ctrl	شاهد هتروزیگوت 4G/5G	۵۰ میکرولیتر
5G/5G Ctrl	شاهد هموزیگوت 5G/5G	۵۰ میکرولیتر
water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

*۱، ۲ یا ۴ تیوب به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت

تمامی مواد کیت که در جدول بالا ذکر شده است باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند. از ذوب و انجماد مکرر این مواد و بیش از سه بار خودداری کنید چرا که باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود.

۴. سایر موارد مورد نیاز

برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:

- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
- سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب
- ورتکس (Vortex Mixer)

- بلوک حرارتی رومیزی (Dry Block Heater)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA
- تیوب ۲ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

۵. نکات قابل توجه

- برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:
- **هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.**
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج ، فضای آماده سازی مواد (برای افزودن میکس به لوله های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به لوله PCR) می باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود 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 شده قرار دهید تا کاملا ذوب شده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- **در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید.**

- 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.

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش PAI-1 4G/5G با این کیت، خون محیطی (peripheral blood) می باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می تواند EDTA یا سترات باشد. خون کامل را می توان تا ۷۲ ساعت در ۴ درجه نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود. برای نگهداری نمونه در زمان های 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 می ماند.

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

۷. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می شود. 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 نمی باشد.

مقادیر بالای بیلروبین (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 نمی کند.

۸. کنترل داخلی

در آزمایش فاکتور PAI-1 4G/5G هر یک از دو آلل طبیعی یا جهش یافته می

تواند به عنوان کنترل داخلی عمل کند زیرا هر فردی حامل یک و یا هر دو نوع این پلی مورفیسم می باشد و 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.

۹. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه پلاسما از روش ها و کیت های مختلفی می توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت های زیر را توصیه می کنیم:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat# 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

۱۰. دستور کار PCR

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 شاهد های مثبت و منفی و یک لوله نیز برای NTC در نظر بگیرید.

توجه داشته باشید که نرم افزار دستگاه در صورتی میتواند ژنوتیپ نمونه ها را تشخیص دهد که هر سه شاهد کیت 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 درپوش لوله ها

را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.
توجه: در صورت استفاده از دستگاه **StepOne** لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی
سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.

۱۱. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!
دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن با کامپیوتر مرتبط کرده و آن
را به برق وصل کنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.
در لوح فشرده همراه کیت روی فایل PAI-1 0.1 و یا PAI-1 0.2 (با توجه به
میکروتیوب های استفاده شده) دوبار کلیک کنید تا برنامه باز شود.
در منوی بالای صفحه بر روی دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) کلیک کنید. روی
پنجره باز شده نیز بر روی دکمه استارت کلیک کنید و فایل را در محل مورد نظر
ذخیره کنید تا دستگاه روشن شود.
در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه یا شاهد را وارد کنید.

۱۲. تنظیم دستگاه StepOne

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

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) می توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از
منوی Define Targets and Samples می توانید 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.

۱۳. تنظیم سایر دستگاه ها

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

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 10 min	1
2	95°C x 15 sec	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 می باشد.

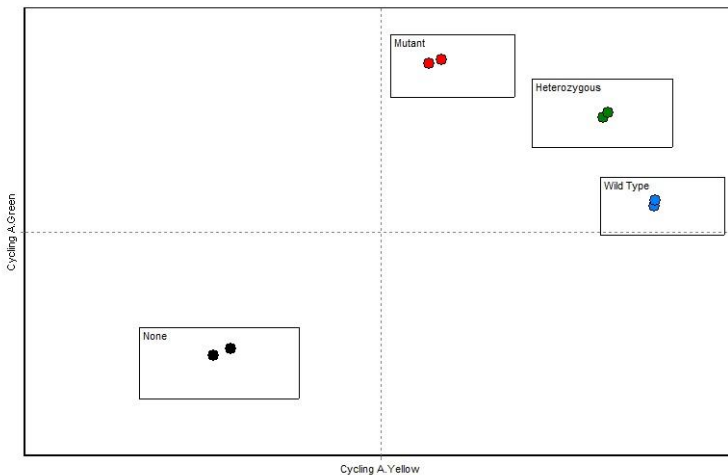
۱۴. آنالیز نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Analysis گزینه other و سپس Scatter Graph Analysis را انتخاب کنید. سپس با استفاده از دکمه Ctrl هر دو کانال Green و Yellow را انتخاب کرده و بر روی گزینه Show کلیک کنید.

توجه داشته باشید که تشخیص ژنوتایپ نمونه ها در صورتی ممکن است که هر سه شاهد کیت 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 می باشد. محور عمودی میزان فلورسانس سبز و محور افقی

میزان فلورسانس زرد را نشان میدهد. توجه داشته باشید که کانال سبز به آلل Mutant یا 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 تقریباً متناسب بوده و این نمونه ها در سمت راست و بالای نمودار یا شمال شرقی قرار میگیرند. نهایتاً نمونه بدون DNA یا نمونه آب دارای تابش سبز و زرد اندکی بوده و این نمونه ها در ناحیه سمت چپ پایین نمودار یا جنوب غربی دیده میشوند.



تصویر ۱: نمایش چگونگی پراکندگی انواع نمونه ها در نمودار Rotor-Gene

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).

۱۵. آنالیز نتایج StepOne

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

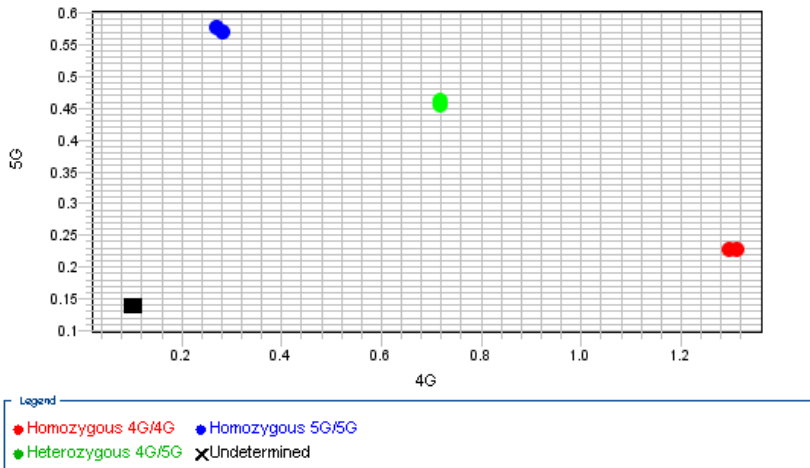
توجه داشته باشید که نرم افزار دستگاه تنها در صورتی می تواند ژنوتایپ نمونه ها را تشخیص دهد که هر سه شاهد کیت و آب یا شاهد بدون DNA در آزمایش استفاده شده باشند!

برای ملاحظه نمودار مورد انتظار شاهد ها به تصویر یک مراجعه کنید. هر نقطه معرف یکی از نمونه ها می باشد. ژنوتایپ شاهد ها و نمونه ها همچنین با رنگ نقاط نیز از هم تفکیک شده اند. هموزیگوت **4G/4G** با آبی، هموزیگوت **5G/5G** با قرمز، هتروزیگوت **5G/4G** با سبز، و نهایتاً نمونه شاهد بدون DNA با رنگ سیاه نشان داده می شوند. ضربدر (x) سیاه نیز نشانگر نمونه ای می باشد که ژنوتایپ آن قابل شناسایی نبوده است.

در هر نمودار محور عمودی میزان فلورسانس FAM و محور افقی میزان فلورسانس VIC را نشان می دهد. توجه داشته باشید که کانال FAM به آلل 4G و کانال VIC به آلل 5G اختصاص دارد. تابش FAM برای نمونه های هموزیگوت 4G/4G چند برابر تابش VIC می باشد و این نمونه ها در ناحیه چپ و بالای نمودار یا شمال غربی تجمع پیدا می کنند. در مقابل تابش VIC برای نمونه های 5G/5G چند برابر تابش FAM است و این نمونه ها در سمت راست و پایین نمودار یا جنوب شرقی مشاهده خواهند شد. در نمونه های هتروزیگوت یا 5G/4G تابش

FAM و VIC تقریباً متناسب بوده و این نمونه ها در سمت راست و بالای نمودار یا شمال شرقی قرار می گیرند. نهایتاً نمونه بدون DNA یا نمونه آب دارای تابش FAM و VIC اندکی بوده و این نمونه ها در ناحیه سمت چپ پایین نمودار یا جنوب غربی دیده می شوند (تصویر یک).

Allelic Discrimination Plot



تصویر ۱: نمودار توزیع کنترل های مثبت و منفی در دستگاه StepOne

توجه! در صورتی که موقعیت شاهد ها در نمودار با آنچه در این راهنما نشان داده شده متفاوت باشد و یا در صورتی که شاهد ها نزدیک به هم و غیر قابل تفکیک باشند آزمایش باید تکرار شود. همچنین در صورتی که نمونه ها با ضربدر (x) سیاه در بین کنترل ها نمایش داده شوند آزمایش باید تکرار شود!

PAI-1 RQ Kit Manual

**For Real-Time PCR Detection of PAI-1 4G/5G
polymorphism**

For use with StepOne and Rotor-Gene
Research use only

NG-WI-ASL-22-101

Version 1.2

March 2019

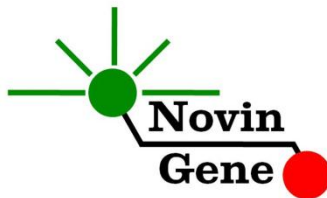


Table of Contents:

1. Introduction	2
2. Kit Contents.....	3
3. Storage and Stability	3
4. General Precautions.....	3
5. Additionally Required Materials	4
6. Specimen, Storage and Transport	4
7. Interfering Substances.....	4
8. Internal Control	4
9. DNA Isolation	5
10. PCR Protocol.....	5
11. Programming Rotor-Gene.....	5
12. Programming StepOne	5
13. Programming Other Machines.....	6
14. Data Analysis: Rotor-Gene.....	6
15. Data Analysis: StepOne	8

PAI-1 RQ kit is for the detection of 4G/5G polymorphism in promoter region of PAI-1 gene in human genomic DNA. This kit is intended for research use only and is designed for StepOne or Rotor-Gene machine.

1. Introduction

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.

PAI-1 RQ kit provides a ready-to-use Real-Time PCR system for detection of PAI-1 4G/5G polymorphism with StepOne or Rotor-Gene machine.

This method applies fluorescent probes allowing detection of amplified product. Analysis of fluorescent kinetics also leads to assessment of the target sequence in the reaction without requiring post-amplification analysis, reducing the possibility of contamination with the PCR product.

2. Kit Contents

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

Label	Content	Quantity
PAI-1 RQ Mix	Ready to use PCR Mix*	480 µl
4G/4G Ctrl	4G/4G Homozygous Control	50 µl
4G/5G Ctrl	4G/5G Heterozygous Control	50 µl
5G/5G Ctrl	5G/5G Homozygous Control	50 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

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

3. Storage and Stability

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

4. General Precautions

In order to prevent false results, always pay attention to the following points:

- Treat all samples as potentially infectious.
- Within the pre-PCR work area assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction, b) Reagent preparation where the master-mix is aliquoted into tubes and c) Reaction preparation area for addition of 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 0.2ml PCR tubes on crushed ice. Use cold blocks instead.

5. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Table top microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipettors and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease free 1.7ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

6. Specimen, Storage and Transport

Required sample for this test is peripheral 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.

7. Interfering Substances

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

8. Internal Control (IC)

Either of 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.

9. 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)

10. PCR Protocol

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

Please note that the software can call the genotype of unknown samples only in the presence of all the controls provided with the kit.

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

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

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

11. Programming Rotor-Gene

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

In the provided CD double click on PAI-1 RQ 0.1 or PAI-1 RQ 0.2 (according to the used microtubes) to open the program. Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop up window click start again and save the run file.

Edit sample names.

12. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set Up menu click on Template and select the file on CD provided with the kit. Click on Plate Setup. One negative control, 3 positive controls and 10 samples are defined. You may change 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 on desired location. Instrument will start shortly.

13. Programming Other Machines

If you apply this kit to other Real-Time PCR machines, program it according to the following table:

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 10 min	1
2	95°C x 15 sec	50
	65°C x 40 sec	

Fluorescence should be collected at 65°C for FAM and VIC dyes. PAI-1 RQ Mix contains 300nM ROX in final reaction.

14. Data Analysis: Rotor-Gene

Analyze data according to manufacturer recommendations. Briefly, click on analysis menu select “Other” and then “Scatter Graph Analysis”. Using Ctrl button, mark both Green and Yellow channels and then click on “Show”.

The “Scatter Graph Window” is now shown in the lower left window. Each dot represents one sample. The vertical axis shows the

Green fluorescence and horizontal axis is for the Yellow fluorescence. Note that 4G allele is detected in 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.

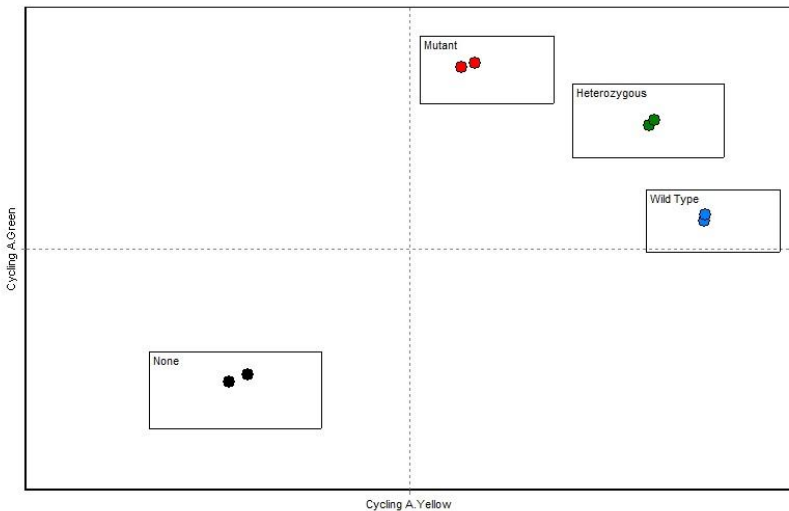


Figure 1: Defining genotypes of different controls of the test on Rotor-Gene instrument.

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).

15. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to manufacturer recommendations. Briefly, click on Analyze and select “Allelic Discrimination” tab. Genotype of the samples are automatically determined by the software based on comparison of their fluorescence with the controls.

Please note that the software can call the genotype of unknown samples only in the presence of all the controls provided with the kit!

Figure 3 represents the typical graph. Each dot represents one sample. All samples are color coded based on their genotype as blue for 4G/4G, Red for 5G/5G, Green for 5G/4G, and Black box for control with no DNA or NTC. Unknown samples will be marked with black "x".

Note that the vertical axis shows the FAM fluorescence and horizontal axis is for the VIC fluorescence. Accordingly, 4G allele is detected in FAM channel and 5G allele in VIC channel. Therefore, samples are located in four regions of the graph. 4G/4G samples with high FAM and low VIC fluorescence gather in upper left; 5G/5G samples with low FAM fluorescence and high 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 2).

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!

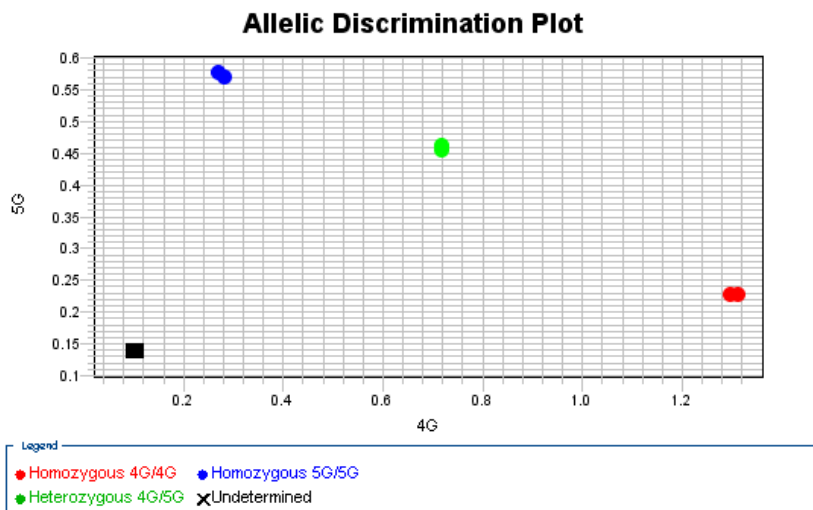


Figure 2: Scatter graph of positive and negative controls on StepOne.