



Duplica^{RealTime} Next FACTOR V H1299R Kit

REV. EER041032_IFU_REV.02D_ENITA

REF : EER041032-32 tests

Instructions For Use

INTENDED USE

Duplica^{RealTime} Next FACTOR V H1299R kit is an *in vitro* nucleic acid amplification test for the detection of the nucleotide substitution A4070G of the blood coagulation Factor V gene in human genomic DNA, extracted from peripheral whole blood samples collected in EDTA.

INTRODUCTION

Thrombophilia is a multigenic disorder caused by inherited and acquired defects. Individuals with multiple defects have a highly increased risk of development of Deep Venous Thrombosis (DVT). The A4070G (FV1299 His-Arg) polymorphism of the Factor V gene (FV; this allele is a part of R2 haplotype) in exon 13 was recently shown to influence circulating FV levels and to contribute to the Activated Protein C (APC) resistance phenotype. Heterozygous of both FV G1691A and FV A4070G substitutions is associated with a significant increasing risk of developing DVT (3-4 times if compared with the single FV R506Q substitution).

PRINCIPLE OF THE TEST

Duplica^{RealTime} Next FACTOR V H1299R kit is designed to identify the nucleotide substitution A4070G in the human Factor V gene. Two reaction mixes are provided for the amplification:

- **AMPLIFICATION MIX**, containing Hot Start Taq DNA polymerase, nucleotides, MgCl₂ and buffer.
- **OLIGO MIX**, containing primers and fluorogenic probes.

Duplica^{RealTime} Next FACTOR V H1299R kit is based on specific recognition and amplification of target sequences by PCR, and the simultaneous detection of the accumulation of PCR amplification products by fluorescent DNA probes. In particular, the probe designed to detect the Wild Type allele carries the fluorophore FAM (6-carboxy-fluorescein) at the 5' end, while the probe detecting the Mutated allele, is labelled with the fluorophore HEX (hexa-chloro-fluorescein). Both the probes have a non fluorescent black quencher at the 3' end. If excited, the whole probe does not emit fluorescence, since the proximity of the quencher to the reporter prevents the emission of the fluorescence from the reporter (quenching effect).

REAGENTS PROVIDED

Each kit contains enough reagents to perform 32 tests when used in 4 analytical sessions with 5 **samples**, 1 **Wild Type control (Control 1, C1)**, 1 **Mutated control (Control 2, C2)** and one **Reaction Blank (BM)** each.

Kit Components

<i>Reagent</i>	<i>Color Code</i>	<i>Storage (range, °C)</i>	<i>Volume (µl)</i>	<i>Quantity (tubes)</i>
Oligo Mix (OM)*	Green Cap	-22÷-18	400	1
Amplification Mix (AM)	Blue Cap	-22÷-18	400	1
Control 1 (C1, Wild Type)	Red Cap	-22÷-18	>50	1
Control 2 (C2, Mutated)	Yellow Cap	-22÷-18	>50	1
Reaction Blank (BM)	White Cap	-22÷-18	>50	1

***protect the tube from direct light**

STORAGE AND HANDLING

All reagents must be stored at **-22÷-18°C** and can be used until the expiry date printed on the labels. Do not freeze and thaw the products more than six times.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Extraction kit for DNA purification (refer to the specific handbook's section)
- Optical tubes or microplate for Real Time PCR
- Disposable powder-free gloves and laboratory coat
- Variable volumes pipettes (5-20 µl, 20-200 µl and 100-1000 µl)
- Disposable RNase/DNase-free tips with aerosol barriers
- Tube racks
- Desktop centrifuge
- PCR box
- Refrigerator
- Deep-freezer
- Thermal cycler for Real Time PCR

The kit has been optimized to be used on DX®/CFX (Bio-Rad) and Applied Biosystems® 7500 (Life Technologies™) thermal cyclers. Other makes and models should be fully tested and evaluated for optimal performance by the user before reporting results.

The equipments should be regularly maintained, in accordance with the manufacturer's instructions, and calibrated to ensure an optimal performance.

PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with Good Laboratory Practice, define three separate laboratory's areas for: DNA extraction, PCR reaction mix preparation; manipulation of controls provided with the kit. Each area must have dedicated pipettes and laminar flow hood
- If required, Clonit offers the necessary technical support for the correct use of the kit.
- Carefully read this Instruction for Use before using the kit
- Do not use the reagents after the expiry date
- Thaw and carefully mix the reagents of the kit before use
- Do not mix the reagents from different lots of the product
- Use calibrated and regularly checked pipettes and instrumentation only
- Use dedicated laboratory equipments. Change gloves frequently
- Periodically wipe the working area with 0,5% hypochlorite
- Use powder-free gloves. Do not leave fingerprints on optical caps. Do not write on caps as this may cause an interference with fluorescent detection
- Materials containing or potentially containing infectious agents must always be manipulated in a separated microbiological safety room under a Biohazard biological hood
- In case of damaged package, contact the technical support before using the kit
- Do not use the product when stored at temperatures other than those indicated on the labels or described in this Instructions For Use
- In case of spillage of the kit contents, please refer to the specific Material Safety Data Sheet (MSDS, available on request)
- The kit reagents, individual protective equipments, used materials, biological samples and test residuals must be disposed in accordance with local regulations
- Patient Drug treatment may interfere with the final result of the molecular biology analysis

OPERATING PROCEDURE

a) DNA purification

For genomic DNA purification Clonit recommends to use:

-Duplica Blood DNA kit (ref. EDI002250) and Duplica NA Body Fluid kit (ref. EDI004200) with Duplica® PREP Automatic Extractor (ref. EDI001) for automated purification.

For manual extraction/purification:

-Fasst DNA Releaser (ref. EMR057050) for **fresh** peripheral blood (i.e. stored for up to 24 hours at 2÷8°C).
-Spin DNA Purification Kit (ref. EMR061050) for **frozen** blood or stored at 2÷8°C for more than 24 hours.

Other extraction reagents and methods should be fully tested and evaluated for optimal performance by the user before reporting results.

Attention! Use blood samples in EDTA anti-coagulant solution.

b) Thermal cycler Setup

Refer to the specific handbook of the equipment used to set the thermal profile indicated in the **Thermal Profile Table**. We recommend to switch on the instrument and to set the thermal profile before preparing the reaction mix.

Attention! The Thermal Profile is platform-specific: be sure to set the correct one.

Bio-Rad DX®/CFX platform

- Select *Create a new Experiment*
- In the *Protocol* section select *Create New* to set the thermal profile
- In *Plate Editor*: set FAM (Wild Type genotype, Allele 1) and HEX (Mutated genotype, Allele 2) as *Fluorophores* and define the sample name

Thermal Profile Table (specific for DX®/CFX)

Time	Temperature	Cycles
10 min	95°C	1
20 sec	95°C	35
60 sec	60°C	Fluorescence Acquisition

Applied Biosystems® 7500 platform

- Select *Create a new Experiment*
- In the *Experiment Properties* select *Quantitation-Standard curve* as experiment type and *Taqman® Reagents* as reagent type
- Select the Run Mode (*7500* or *7500 Fast*) and the Ramp Speed (*Standard*)
- In the *Setup* menu select *Run Method* to set the thermal profile
- In the *Setup* menu select *Plate Setup-Define Targets and Samples* to select Samples and assign VIC target to MUT (Mutated genotype) and FAM target to WT (Wild-Type genotype). Leave the default value (*NFQ-MGB*) as quencher type
- In *Define Samples* insert the sample name
- Select the used wells in *Plate Setup-Assign Targets and Samples*
- Select *None* as passive reference

Thermal Profile Table (specific for Applied Biosystems® 7500)

Time	Temperature	Cycles
10 min	95°C	1
20 sec	95°C	35
60 sec	62°C	Fluorescence Acquisition

c) Preparation of PCR mix

The total reaction volume is **25 µl**.

For each experiment prepare a PCR mix for the **2 controls (C1 and C2)**, 1 **Reaction Blank (BM)** and **n+1** samples. The reagents of the PCR mix have to be mixed as indicated in the table below:

REAGENT	VOLUME (µl)
Amplification mix	10
Oligo mix	10
Extracted DNA	5

The PCR mix has to be freshly prepared every time.

After its preparation, aliquot **20 µl of Master Mix** in the tubes or in the microplates well for PCR then add in each tube/well **5 µl** (100-250 ng/reaction) from the **extracted DNA** or **control DNA**, place in order the tubes/microplate in the instrument and start the program of amplification. At the end of the program remove the tubes/microplate from the thermal cycler.

d) ANALYSIS and INTERPRETATION of the RESULTS

d.1) Pre-analysis settings

DX/CFX platform

-In *Plate Editor*: set FAM (wild-type genotype, Allele 1) and HEX (mutated genotype, Allele 2) as *Fluorophores* and define the sample name.

ABI 7500 platform

-In the *Setup* menu select *Plate Setup-Define Targets and Samples* to select Samples and to assign VIC target to MUT (Mutated genotype) and FAM target to WT (Wild Type genotype)

-In *Define Samples* insert the sample name

-Select the used wells in *Plate Setup-Assign Targets and Samples*

-Select *None* as passive reference

d.2) Data analysis and Interpretation of the Results

DX/CFX platform

-Select *C(t) Determination Mode* and *Regression* in the *Settings* menu to display the relative scatter plot

-In the *View/Edit Plate* menu set the reaction blank as *NTC*

-In the *Allelic Discrimination* menu select *RFU* and flag the *Normalize Data* in the *Display Mode*

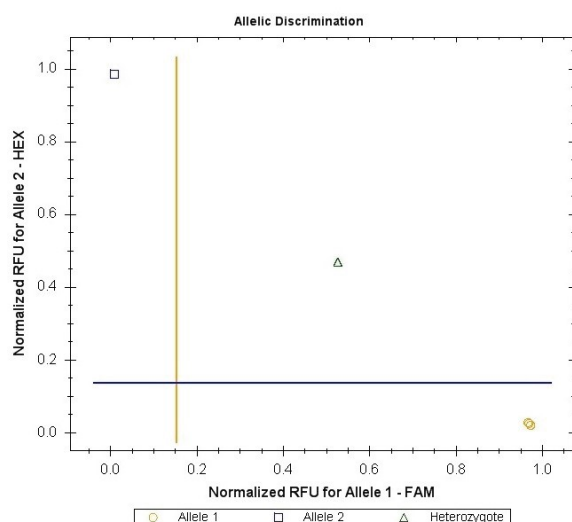
-For both Fluorophores set manually the Threshold to 0,15

The scatter plot displays four quadrants in which each spot represents the two fluorescent signals for a single sample:

Condition in which no signal is detected indicates PCR inhibition.

Control 1 results positive in FAM and negative in HEX/VIC, whereas **Control 2** results positive in HEX/VIC and negative in FAM.

If all these conditions have been met, the run is valid and it is possible to analyse the data; otherwise the run is not valid. It is responsibility of the user to validate the run by checking that these conditions have been met.

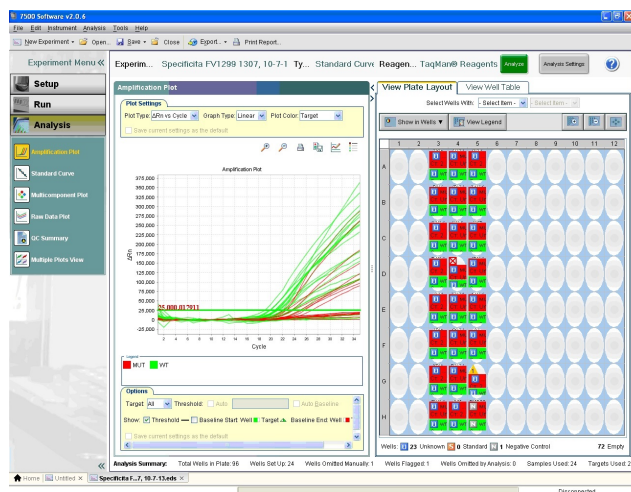


The corresponding genotype of the samples is reported in a table displayed close to the Scatter Plot:

Bottom Left Quadrant	Reaction Blank/No Amplification
Bottom Right Quadrant	WT Samples (<i>Allele 1</i>)
Upper Left Quadrant	MUT Samples (<i>Allele 2</i>)
Upper Right Quadrant	Heterozygote Samples (<i>Both Alleles</i>)

ABI 7500 platform

-Select *Analysis Settings* in the *Analysis* menu to manually set the threshold to 35000 and flag the *Automatic Baseline*



-Select *Analyze* in the *Analysis* menu to visualize the amplification graph of the targets for each sample:

-Select *View Well Table* to display the *C_T* values for all samples.

Refer to the following table for a correct interpretation of the results:

<i>C_T</i> value range ^	Sample suitability	Result	Genotype
<i>C_T</i> FAM and <i>C_T</i> VIC >30	Unsuitable	Invalid*	-
<i>C_T</i> FAM <30 and <i>C_T</i> VIC - <i>C_T</i> FAM >5	Valid	Valid	Homozygote Wild Type (WT)
<i>C_T</i> VIC <30 and <i>C_T</i> FAM - <i>C_T</i> VIC >5	Valid	Valid	Homozygote Mutated (MUT)
<i>C_T</i> FAM or <i>C_T</i> VIC <30 and <i>C_T</i> VIC - <i>C_T</i> FAM ≤2.5	Valid	Valid	Heterozygote
<i>C_T</i> FAM or <i>C_T</i> VIC <30 and 2.5< <i>C_T</i> VIC - <i>C_T</i> FAM ≤5	Unsuitable	Equivocal*	Undetermined

^ If the *C_T* value is “undetermined”, assume ***C_T*=35**.

° | ***C_T* VIC - *C_T* FAM**| indicates the absolute value of *C_T* difference.

* **Repeat Extraction and Analysis. Invalid:** Amplification not present or inefficient; problem with the extraction (i.e. DNA loss, presence of inhibitors in the sample or starting material too poor). **Equivocal:** Inefficient amplification or extraction (i.e. inhibitors in the sample or starting material too high) do not allow the correct genotyping of the sample.

-Refer to the following table for Control 1 and Control 2 suitability:

Control	FAM	HEX/VIC	<i>C_T</i> value
1	positive	negative	22-25
2	negative	positive	22-25

If all these conditions have been met, the run is valid and it is possible to analyse the data; otherwise the run is not valid. It is responsibility of the user to validate the run by checking that these conditions have been met.

TROUBLESHOOTING

Problem 1: Weak or no signal of unknown samples.

1. The PCR was inhibited:
 - Make sure to use a recommended DNA purification method and carefully follow the manufacturer's instructions.
2. Pipetting error due to omitted reagents or samples:
 - Repeat the analysis starting from the PCR.
3. Deterioration of dyes and/or primers. The reagents storage conditions did not comply with the instructions:
 - Check storage conditions.
4. Very low starting amount and/or low purity of genomic DNA. Improper DNA extraction:
 - Repeat the DNA purification.
5. Wrong channel/filter was chosen. The PCR conditions did not comply with the instructions:
 - Check the PCR conditions and select the fluorescence channels reported in the protocol for the Unknown Sample detection.

Problem 2: Weak or no signal of the Wild Type Control C1 and/or Mutated Control C2.

1. The PCR conditions did not comply with the instructions:
 - Check the amplification protocol and select the fluorescence channel reported in the manual.
2. Deterioration of dyes and/or primers. The reagents storage conditions did not comply with the instructions:
 - Check storage conditions.

Problem 3: Any signal with Reaction Blank BM.

1. Contamination during PCR preparation procedure. All samples results are INVALID:
 - Decontaminate the working area and all instruments.
 - Pipette the controls C1 and C2 at last.
 - Repeat the PCR preparation using a new set of reagents.

Problem 4: HEX signal in Wild Type Control C1 and/or FAM signal in Mutated Control C2.

1. Contamination during PCR preparation procedure. All samples results are INVALID:
 - Decontaminate the working area and all instruments.
 - Use tips with aerosol barriers only. Change tips between tubes/wells.
 - Repeat the PCR preparation using a new set of reagents.

Problem 5: Fluorescence intensity varies.

1. The PCR Master Mix is not well prepared:
 - Carefully repeat the PCR preparation procedure.
2. Air bubbles trapped in the PCR tubes:
 - Check the presence of air bubbles before starting a new run.

Problem 6: Absence of any fluorescent signal.

1. Verify the performance of the thermal cycler:
 - Calibrate the equipment.
2. Deterioration of dyes and/or primers. The storage conditions did not comply with the instructions:
 - Check storage conditions.
 - Check the expiry date of the kit.

Problem 7: The thermal cycler gives an error message.

1. Refer to the Real Time PCR instrument user manual or contact the local technical support of the Real Time PCR instrument company.

Problem 8: The kit reagents left out of the storage range temperature.

1. These reagents must be stored as indicated for a proper execution of the test. The performance of the product is not guaranteed if the reagents have not been properly stored.



Duplica^{RealTime} Next FACTOR V H1299R Kit

REV. EER041032_IFU_REV.02D_ENITA

REF : EER041032-32 test

Istruzioni Per l'Uso

FINALITA' D'USO

Il **Duplica^{RealTime} Next FACTOR V H1299R kit** è un test di amplificazione di acidi nucleici *in vitro* per la ricerca della sostituzione nucleotidica A4070G del gene che codifica per il gene Fattore V della cascata coagulativa, nel DNA ottenuto da campioni clinici di sangue intero periferico, raccolti in EDTA.

INTRODUZIONE

La trombofilia è una patologia multigenica in cui la combinazione di polimorfismi genetici aumenta il rischio di trombosi venosa profonda (Deep Venous Thrombosis, DVT). Il Polimorfismo A4070G (FV1299 His-Arg) presente nell'esone 13 del gene del Fattore V (FV, questo allele è una parte di un aplotipo chiamato R2) è stato dimostrato influenzare il livello di FV circolante e contribuisce al fenotipo attivato di resistenza della proteina la C (Activated Protein C, APC). Il doppio eterozigote per FV 1691A e FV (A4070G) conferisce un aumento di 3- 4 volte del rischio relativo di tromboembolismo venoso rispetto alla sola sostituzione FV R506Q.

PRINCIPIO DEL TEST

Il **Duplica^{RealTime} Next FACTOR V H1299R kit** è stato disegnato per riconoscere la mutazione corrispondente alla sostituzione nucleotidica A4070G nel gene umano Fattore V. I reagenti per la reazione di amplificazione sono pronti all'uso e suddivisi in due mix di reazione:

- **AMPLIFICATION MIX**, contenente Hot Start Taq DNA polimerasi, nucleotidi, MgCl₂ e buffer.
- **OLIGO MIX**, contenente i primers e le sonde fluorogeniche.

Il **Duplica^{RealTime} Next FACTOR V H1299R kit** è basato sul riconoscimento specifico e amplificazione di sequenze target di PCR e sulla rilevazione simultanea dei prodotti di PCR tramite sonde fluorescenti a DNA.

Vengono usate due sonde marcate con un differente fluoroforo per ogni sequenza investigata; in particolare la sonda per l'allele Wild Type porta all'estremità 5' il fluoroforo FAM (6-carbossi-fluoresceina) mentre l'altra sonda, che va a rilevare l'allele Mutato, ha legato il fluoroforo HEX (esa-cloro-fluoresceina). Entrambe le sonde hanno all'estremità 3' un quencher non fluorescente. Se eccitata, la sonda integra non emette fluorescenza, in quanto la vicinanza del quencher al reporter impedisce a quest'ultimo l'emissione della fluorescenza (effetto di quenching).

COMPOSIZIONE DEL KIT

Questo kit è stato realizzato per poter eseguire 32 reazioni se utilizzato in 4 sessioni analitiche con 5 **campioni**, 1 **controllo Wild Type (Controllo 1, C1)**, 1 **Controllo Mutato (Controllo 2, C2)** e 1 **Bianco di Reazione (BM)** ciascuna.

Componenti del kit

Reagenti	Codice Colore	Conservazione (range, °C)	Volume (µl)	Quantità (tubi)
Oligo Mix (OM)*	Tappo Verde	-22÷-18	400	1
Amplification Mix (AM)	Tappo Blu	-22÷-18	400	1
Controllo 1 (C1, Wild Type)	Tappo Rosso	-22÷-18	>50	1
Controllo 2 (C2, Mutato)	Tappo Giallo	-22÷-18	>50	1
Bianco di Reazione (BM)	Tappo Bianco	-22÷-18	>50	1

***la provetta deve essere conservata lontano dalla luce**

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Tutti i reagenti devono essere conservati a **-22÷-18°C** fino alla data di scadenza riportata sulla confezione. Non scongelare e ricongelare il prodotto più di sei volte.

MATERIALE NECESSARIO NON FORNITO

- Kit di estrazione per la purificazione del DNA (fare riferimento alla sezione specifica del relativo manuale d'uso)
- Tubi ottici o micropiastra ottica per Real-Time PCR
- Guanti RNasi/Dnasi-free senza polvere e camice da laboratorio monouso
- Micropipette (5 -20 µl, 20-200 µl e 100-1000 µl)
- Puntali con filtro DNasi/RNasi-free
- Porta provette
- Centrifuga da tavolo
- PCR box
- Refrigeratore
- Congelatore
- Termociclatore per Real Time PCR.

Il kit è stato ottimizzato per le piattaforme DX[®]/CFX (Bio-Rad) e Applied Biosystems[®] 7500 (Life Technologies[™]). Altre marche e modelli devono essere pienamente testati e valutati per prestazioni ottimali da parte dell'utente prima di refertare i risultati.

La strumentazione deve essere mantenuta regolarmente, in accordo con le istruzioni del produttore, e calibrato in modo da assicurare prestazioni ottimali.

PRECAUZIONI E RACCOMANDAZIONI

- È buona pratica suddividere il laboratorio in tre aree distinte: estrazione del DNA, preparazione della miscela di PCR, e manipolazione dei controlli forniti con il kit. Ogni area deve essere completa di cappa a flusso laminare e di un set di pipette dedicato
- Clonit offre se richiesto ai suoi clienti il supporto tecnico necessario per il corretto utilizzo del kit
- Leggere attentamente questo manuale di Istruzioni Per l'Uso prima di utilizzare il kit
- Non utilizzare reagenti dopo la data di scadenza
- Scongelare e miscelare attentamente i reagenti prima dell'utilizzo
- Non mescolare reagenti provenienti da lotti diversi del prodotto
- Usare pipette e strumentazione tarata e controllata regolarmente
- Usare attrezzatura di laboratorio dedicata e cambiare spesso i guanti
- Pulire regolarmente l'area di lavoro con ipoclorito al 0,5%
- Utilizzare i guanti senza talco e evitare di lasciare impronte sui tappi ottici. Non scrivere sui tappi ottici per evitare problemi nella rilevazione della fluorescenza
- I materiali contenenti o sospettati di contenere agenti infettivi devono essere sempre manipolati all'interno di una stanza a sicurezza microbiologica e sotto una cappa biologica Biohazard
- In caso di imballo danneggiato del kit, prima dell'utilizzo contattare l'assistenza tecnica
- Non utilizzare il prodotto se conservato in condizioni ambientali diverse da quelle riportate in etichetta e descritte nella specifica sezione di questo manuale di Istruzioni Per l'Uso
- In caso di sversamento del contenuto del kit riferirsi alla Scheda di Sicurezza specifica del prodotto (Material Safety Data Sheet, MSDS; disponibile su richiesta)
- I reagenti del kit, le misure di protezione individuali, i materiali utilizzati, e i residui dei campioni biologici e del test vanno smaltiti in conformità con le norme in vigore nel Paese di utilizzo
- Il trattamento farmacologico potrebbe interferire con il risultato finale

PROTOCOLLO OPERATIVO

a) Purificazione del DNA

Per la purificazione del DNA genomico Clonit raccomanda:

-Duplicα Blood DNA kit (ref. EDI002250) e Duplicα NA Body Fluid kit (ref. EDI004200) per Duplicα®PREP Automatic Extractor (ref. EDI001) nel caso di estrazione automatica.

Nel caso di estrazione/purificazione manuale:

-Fasst DNA Releaser (ref. EMR057050) per sangue **fresco** (conservato fino a un massimo di 24 ore a 2÷8°C).

-Spin DNA Purification Kit (ref. EMR061050) per sangue **congelato** o conservato a 2÷8°C per più di 24 ore.

Altri reagenti e metodi di estrazione devono essere pienamente testati e valutati per prestazioni ottimali da parte dell'utente prima di refertare i risultati.

Attenzione! Utilizzare sangue in soluzione anticoagulante EDTA.

b) Programmazione del termociclatore

Riferirsi allo specifico manuale dello strumento assicurandosi di impostare il profilo termico indicato in tabella (**Profilo Termico**). Raccomandiamo di accendere e programmare il termociclatore prima di allestire la miscela di reazione.

Attenzione! Il Profilo Termico cambia a seconda della piattaforma: assicurarsi di averlo impostato correttamente.

Piattaforma Bio-Rad DX®/CFX

- Selezionare *Create a new Experiment*
- Nella sezione *Protocol* impostare il profilo termico in *Create New* come indicato in tabella
- Selezionare i campioni e impostare i fluorofori FAM (genotipo Wild Type, Allele 1) ed HEX (genotipo Mutato, Allele 2) nel menu *Plate Editor*

Tabella Profilo Termico (per DX®/CFX)

Tempo	Temperatura	Cicli
10 min	95°C	1
20 sec	95°C	35
60 sec	60°C	Acquisizione Fluorescenza

Piattaforma Applied Biosystems® 7500

- Selezionare *Create a New Experiment*
- Nella sezione *Experiment Properties* definire il nome e il tipo di esperimento (*Quantitation-Standard Curve*)
- Infine, impostare il tipo di tecnologia (*Taqman® Reagents*), la modalità di esecuzione (Run Mode: 7500 o 7500 Fast) e la velocità di ramping (Ramp Speed: Standard)
- Nel menu *Setup* selezionare *Run Method* e impostare il profilo termico come indicato in tabella
- Nel menu *Setup* selezionare *Plate Setup-Define Targets and Samples* per selezionare i campioni e assegnare il target VIC a MUT (genotipo Mutato) e il target FAM a WT (genotipo Wild Type)
- Nella sezione *Define Samples* inserire il nome del campione
- Selezionare i pozzetti in uso in *Plate Setup-Assign Targets and Samples*
- Selezionare *None* nella tendina *Select the dye to use as the passive reference*

Tabella Profilo Termico (per Applied Biosystems® 7500)

Tempo	Temperatura	Cicli
10 min	95°C	1
20 sec	95°C	35
60 sec	62°C	Acquisizione Fluorescenza

c) Preparazione della PCR mix

Il volume totale della reazione è di **25 µl**.

Per ogni esperimento preparare una mix di PCR per i **2 controlli (C1 e C2)**, 1 **Bianco di Reazione (BM)** e **n+1** campioni. La mix deve essere preparata miscelando i reagenti come indicato in tabella:

REAGENTI	VOLUME (µl)
Amplification mix	10
Oligo mix	10
DNA Estratto	5

Non conservare la mix di PCR ma prepararla fresca ogni volta.

Terminata la preparazione della mix, aliquotare **20 µl** della **Master Mix** nelle provette o nei pozzetti della micropiastra per PCR e aggiungere in ogni provetta/pozzetto **5 µl** di **DNA estratto** (100-250 ng/reazione) o dei **controlli**; disporre le provette o la piastra all'interno dello strumento e avviare il programma di amplificazione precedentemente impostato.

d) ANALISI ed INTERPRETAZIONE dei RISULTATI

d.1) Impostazioni pre-analisi

Piattaforma DX/CFX

-Selezionare i campioni e impostare i fluorofori FAM (genotipo wild-type, Allele 1) ed HEX (genotipo mutato, Allele 2) nel menu *Plate Editor*.

Piattaforma ABI 7500

-Nel menu *Setup* selezionare *Plate Setup-Define Targets and Samples* per selezionare i campioni e assegnare il target VIC a MUT (genotipo Mutato) e il target FAM a WT (genotipo Wild Type).

- Nella sezione *Define Samples* inserire il nome del campione.

-Selezionare i pozzetti in uso in *Plate Setup-Assign Targets and Samples*

-Selezionare *None* nella tendina *Select the dye to use as the passive reference*

d.2) Analisi dei dati e Interpretazione dei Risultati

Piattaforma DX/CFX

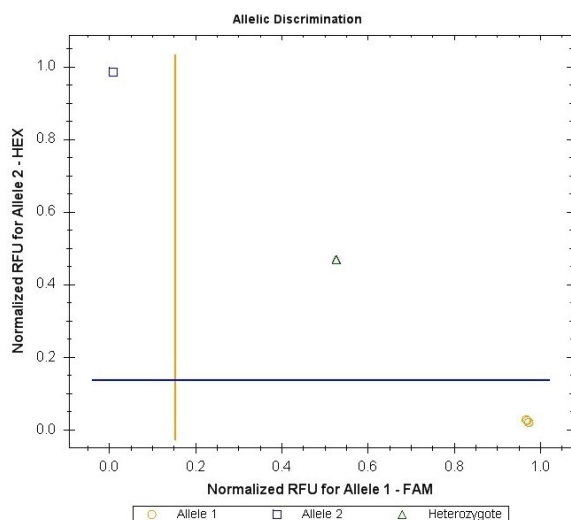
-Selezionare *C(t) Determination Mode and Regression* nel menu *Settings* per visualizzare il corrispondente scatter plot.

-Impostare il bianco di reazione come NTC in *View/Edit Plate*

-In *Allelic Discrimination* impostare *RFU* e *Normalize Data*

-Impostare manualmente le linee di Threshold a 0,15

Lo scatter plot è diviso in quattro quadranti:

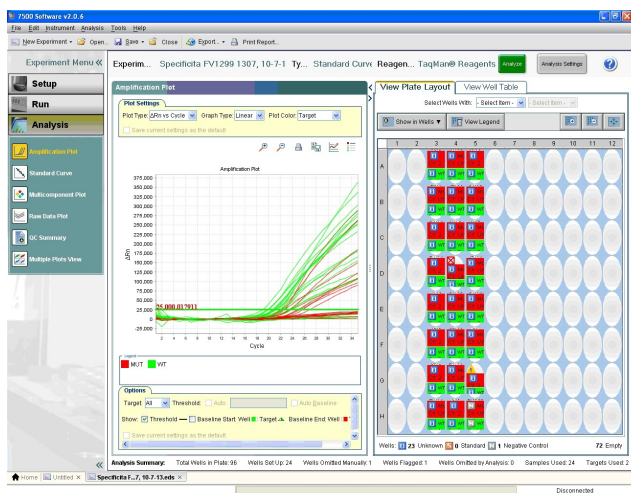


I segnali inclusi in ciascun quadrante corrispondono rispettivamente a campioni con il seguente genotipo:

Quadrante in basso a destra	Campioni Wild Type (WT- <i>Allele 1</i>)
Quadrante in alto a sinistra	Campioni Mutati (MUT- <i>Allele 2</i>)
Quadrante in alto a destra	Campioni Eterozigoti (HET- <i>entrambi gli Alleli</i>)

Piattaforma ABI 7500

-Nel menu *Analysis* impostare manualmente le linee di Threshold di entrambi i target a 35000 in *Analysis Settings* e selezionare *Automatic Baseline*



-Premere *Analyze* per visualizzare il grafico di amplificazione dei fluorofori di ciascun campione:

Dal menu *View Well Table* è possibile osservare i valori dei C_t dei campioni ottenuti nella corsa.

Per l'interpretazione dei risultati si riporta la seguente tabella:

Intervallo C_t ^	Idoneità del campione	Risultato	Genotipo
C_t FAM e C_t VIC >30	Non idoneo	Non valido*	-
C_t FAM <30 e C_t VIC - C_t FAM >5	Idoneo	Valido	Omozigote Wild Type (WT)
C_t VIC <30 e C_t FAM - C_t VIC >5	Idoneo	Valido	Omozigote Mutato (MUT)
C_t FAM e C_t VIC <30 e $ C_t$ VIC - C_t FAM ≤2.5	Idoneo	Valido	Eterozigote
C_t FAM e C_t VIC <30 e $2.5 < C_t$ VIC - C_t FAM ≤5	Non idoneo	Dubbio*	Non genotipizzabile

^ Se il valore di C_t è "undetermined", considerare il valore di **$C_t = 35$** .

° $|C_t$ VIC - C_t FAM| indica il valore assoluto della differenza dei C_t .

* **Ripetere Estrazione e Analisi. Non valido:** Si sono verificati problemi nella fase di amplificazione (amplificazione non efficiente o assente) o di estrazione (perdita del DNA, presenza di inibitori nel campione o materiale di partenza insufficiente) che possono causare risultati errati.

Dubbio: Amplificazione o estrazione non efficiente (presenza di inibitori o materiale di partenza troppo elevato) che non permettono di genotipizzare correttamente il campione.

-Si faccia riferimento alla seguente tabella per verificare l'accettabilità del **Controllo 1** e **Controllo 2**:

Controllo	FAM	HEX/VIC	C_t
1	positivo	negativo	22-25
2	negativo	positivo	22-25

Se si verificano queste due condizioni la corsa è valida ed è possibile analizzare i dati, altrimenti la corsa non è valida. È responsabilità dell'operatore convalidare la corsa controllando che queste due condizioni si siano verificate.

TROUBLESHOOTING

Problema 1: Segnale debole o assente nei campioni analizzati.

- La PCR è stata inibita:
 - Assicurarsi di utilizzare un metodo di estrazione di DNA validato e seguire attentamente le istruzioni riportate nel manuale d'uso del produttore.
- Errore nel pipettaggio per omissione di un reagente o del campione:
 - Ripetere l'analisi partendo dalla PCR.
- Deterioramento dei fluorofori/primers. Le condizioni di stoccaggio non sono conformi alle istruzioni riportate nel manuale d'uso:
 - Verificare le condizioni di conservazione del kit.
- Quantità di DNA insufficiente e/o di bassa purezza. Estrazione di DNA inefficiente:
 - Ripetere l'estrazione del DNA.
- Selezione del canale/filtro sbagliato. Le condizioni di preparazione di PCR non sono conformi alle istruzioni riportate nel manuale d'uso:

- Verificare le condizioni di PCR e selezionare i canali di fluorescenza riportati nel protocollo per la rilevazione del campione ignoto.

Problema 2: Segnale debole o assente nel controllo Wild Type C1 e/o controllo Mutato C2.

1. Le condizioni di PCR non rispecchiano le istruzioni riportate:
 - Verificare il protocollo di amplificazione e selezionare il canale di fluorescenza riportato nel manuale.
2. Deterioramento dei fluorofori/primers. Le condizioni di stoccaggio dei reagenti non sono conformi alle istruzioni riportate nel manuale d'uso:
 - Verificare le condizioni di conservazione del kit.

Problema 3: Presenza di segnale nel Bianco di Reazione BM.

1. Contaminazione durante la procedura di estrazione del DNA. Tutti i risultati sono da considerarsi INVALIDI:
 - Decontaminare il piano di lavoro e tutti gli strumenti.
 - Manipolare i controlli C1 e C2 solo alla fine.
 - Ripetere la PCR utilizzando un nuovo set di reagenti.

Problema 4: Segnale HEX nel controllo Wild Type C1 e/o segnale FAM nel controllo Mutato C2.

1. Contaminazione durante la procedura di preparazione della PCR. Tutti i risultati sono da considerarsi INVALIDI:
 - Decontaminare il piano di lavoro e tutti gli strumenti.
 - Usare solo puntali con filtro durante la procedura. Cambiare puntali per ogni tubo/pozzetto.
 - Ripetere la PCR utilizzando un nuovo set di reagenti.

Problema 5: Intensità di fluorescenza variabile.

1. La Master Mix di PCR non è stata miscelata bene:
 - Ripetere attentamente la procedura di preparazione della PCR.
2. Presenza di bolle d'aria nei tubi/piastra di PCR:
 - Eliminare le eventuali bolle presenti prima di iniziare una nuova corsa.

Problema 6: Assenza completa di segnale.

1. Controllare le prestazioni del termociclatore:
 - Effettuare la calibrazione dello strumento.
2. Deterioramento dei fluorofori/primers. Le condizioni di stoccaggio non sono conformi alle istruzioni riportate nel manuale d'uso:
 - Verificare le condizioni di conservazione del kit.
 - Verificare la data di scadenza del kit.

Problema 7: Il termociclatore dà un messaggio di errore.

1. Consultare il manuale di Istruzioni Per l'Uso dello strumento o contattare il supporto tecnico.

Problema 8: I reagenti del kit sono stati lasciati fuori dall'intervallo di temperatura di stoccaggio.

1. Questi reagenti devono essere conservati come indicato per una corretta esecuzione del test. Le prestazioni del prodotto non sono garantite se questi reagenti non sono stati correttamente conservati.

Legenda dei Simboli Utilizzati Key to symbols used			
	Codice del prodotto <i>Catalogue number</i>		Limitazioni di temperatura <i>Temperature limitation</i>
	Dispositivo medico diagnostico in vitro <i>In Vitro Diagnostic Medical Device</i>		Revisione <i>Revision</i>
	Numero di lotto <i>Batch code</i>		Leggere le istruzioni d'uso <i>Consult instructions for use</i>
	Data di scadenza <i>Use by</i>		Sufficiente per un <n> di test <i>Contains sufficient for <n> tests</i>
	Fabbricante <i>Manufacturer</i>		Conforme ai requisiti della Direttiva 98\79\CE <i>According to 98/79/CE Directive</i>



CLONIT S.r.l.

Headquarter: Via Varese 20 – 20121 Milano

Production Site: Viale Lombardia, 6 - 27010 Siziano (PV)

Tel. + 39. (0)2.56814413 fax. +39. (0)2.56814515

www.clonit.it - info@clonit.it

