



Duplica^{RealTime} Beta-Fibrinogen 455G>A Genotyping Kit

REV. EER049050_IFU_REV.01D_ENITA

REF : EER049050-50 tests

Instructions For Use

INTENDED USE

Duplica^{RealTime} Beta-Fibrinogen 455G>A Genotyping Kit is an *in vitro* nucleic acid amplification test for the detection of the allelic variant 455G>A in the promoter region of the Human Beta-Fibrinogen gene, in genomic DNA purified from peripheral blood collected in EDTA.

INTRODUCTION

Increased plasma fibrinogen levels have been identified as a risk indicator for myocardial infarction, stroke, and thrombosis. Both environmental and genetic factors make an important contribution to plasma fibrinogen levels in humans. Fibrinogen (Factor I) is a glycoprotein, synthesized in the liver, that participates in the coagulation cascade. Fibrinogen converts to fibrin in the presence of thrombin. Elevated fibrinogen levels have been associated with increased risk for atherosclerosis and deep venous thrombosis as well as cardiovascular diseases. Fibrinogen is composed of three pairs of polypeptide chains (named α , β and γ) which are linked by disulfide bonds. These three chains are encoded by three different genes (α , β and γ , respectively), that are located on chromosome 4.

Among genetic factors, a common G $\rightarrow$ A polymorphism at position - 455 in the promoter region of the Beta-Fibrinogen gene has been associated with elevated fibrinogen levels (for the AA homozygous carriers).

PRINCIPLE OF THE TEST

Duplica^{RealTime} Beta-Fibrinogen 455G>A Genotyping has been designed to detect the 455G>A polymorphism in the promoter region of the Beta-Fibrinogen gene.

The reagents for the amplification reaction are ready to use and provided in two reaction mixes:

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

Duplica^{RealTime} Beta-Fibrinogen 455G>A Genotyping 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

The kit has been designed to perform 50 reactions, this format allows to perform 2 runs, each of which includes: **25 samples, 1 Wild Type Control (Control 1, C1), 1 Mutated Control (Control 2, C2) and 1 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	600	1
Amplification Mix (AM)	Blue Cap	-22 ÷ -18	600	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 specific handbook's section)
- Disposable powder-free gloves and laboratory coat
- Variable volumes pipettes (5-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)
- Disposable DNase/RNase-free tips with aerosol barriers
- Tube racks
- Desktop centrifuge
- PCR box
- Disposable optical polypropylene tubes for Real Time PCR
- Refrigerator
- Deep-freezer
- Thermal cycler for Real Time PCR **Rotor-Gene®Q** (Qiagen)

All the equipments should be regularly maintained, in accordance with the manufacturer's instructions, and calibrated to ensure 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 or write on optical part of the tubes/microplates
- 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 of the product (MSDS, available on request)
- The kit reagents, individual protective equipments, used materials, biological samples and test residuals must be disposed of according to 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 from whole blood samples (200µl extraction volume), Clonit recommends to use:

- the automated platform **QIAasymphony®SP** (Qiagen). For the extraction procedure follow the protocol reported in the user manual of instrumentation (**QIAasymphony DNA mini kit, Qiagen**), starting from 200 µl of whole blood and eluting in 200 µl of Elution Buffer.

- the automated platform **Duplica® PREP Automatic Extractor** (ref. EDI001) to be used with Duplica Blood DNA kit (ref. EDI002250) and Duplica NA Body Fluid kit (ref. EDI004200).

For manual extraction/purification:

- Fasts 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.

Conservation and quality of purified DNA

The purified genomic DNA should be kept at 2÷8°C if the analysis is performed within 24-72 h, in case of a longer storage period is better to store it at -20°C (or -80°C).

b) Rotor-Gene®Q Thermalcycler setup

- Open the software and select *Advanced* on the box *New Run*

- Select a *new template* in *Empty Run* or a pre-existing one

- Select the Rotor Type of your instrument and then *Next*

- Identify the operator, the sample and the final volume of the amplification reaction (**25 µl**) and then *Next*

- Select *Edit Profile* in the *New Run Wizard* and set up the correct Thermal Profile as indicated in the table below

- Select *Gain Optimisation* in the *New Run Wizard*

- In *Channel Settings* scroll menu, select *Acquiring Channels* and click *Add*

- Set the following parameters for channels Green and Yellow: tube position "1", target sample range "5 FI to 10 FI", acceptable gain range " -10 to 10"

- Flag the option *Perform Optimisation before 1st acquisition*

- Close the window and select *Next* and *Start Run*.

N.B.: before starting the run is recommended to save the file as "Template". In this way it is possible to save the Thermal Profile and Gain Optimisation settings and recall them in subsequent runs.

Thermal Profile.

Time	Temperature	Cycles
10 min	95°C	1
20 sec	95°C	45
30 sec	60°C	Fluorescence Acquisition Green and Yellow channels

c) Preparation of PCR mix

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

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

After its preparation, aliquot **20 µl of Master Mix** in the PCR tubes, then add in each tube **5 µl of extracted DNA or control DNA**, place in order the tubes in the instrument and start the program of amplification. At the end of the program remove the tubes from the thermalcycler.

d) ANALYSIS and INTERPRETATION of RESULTS

The fluorescence in each channel indicates the hybridisation of the allelic specific probes: **Channel Green** for **Wild Type Allele probe (fluorophore FAM)** and **Channel Yellow** for **Mutated Allele probe (fluorophore HEX)**. If a sample shows fluorescence in **Green (FAM)**, the sample has the **Wild Type Allele**. If a sample shows fluorescence in **Yellow (HEX)**, the sample has the **Mutated Allele**.

The results are interpreted through the analysis of the Threshold Cycle (C_T) for each sample using the **"Allelic Discrimination"** function.

The threshold cycle is defined as the cycle at which the amplification curve crosses the threshold (Threshold line). During the first few cycles of PCR amplification the background fluorescence is calculated. Subsequently, it will be used for the calculation of the fluorescence baseline.

For the interpretation of results on Rotor-Gene®Q platform refer to the following indications:

- Select *Analysis* from the toolbar menu then click *Allelic Discrimination*
- Select the 2 channels: Cycling A.Green e Cycling A.Yellow by keeping pressed the SHIFT key on the keyboard
- Click *Show*

In this way, for each sample, the fluorescence data combined are shown (**Fig.1**): the **smooth line** represents the fluorescence signal in **Green (Wild Type Allele)** and the **line with circles** the fluorescence signal in **Yellow (Mutated Allele)**. Before setting the threshold value for genotyping of the samples, it is appropriate to optimize the fluorescence data using the options of normalization of the signal and background reduction of fluorescence offered by the software. The use of these functions allows to avoid any non-specific signals.

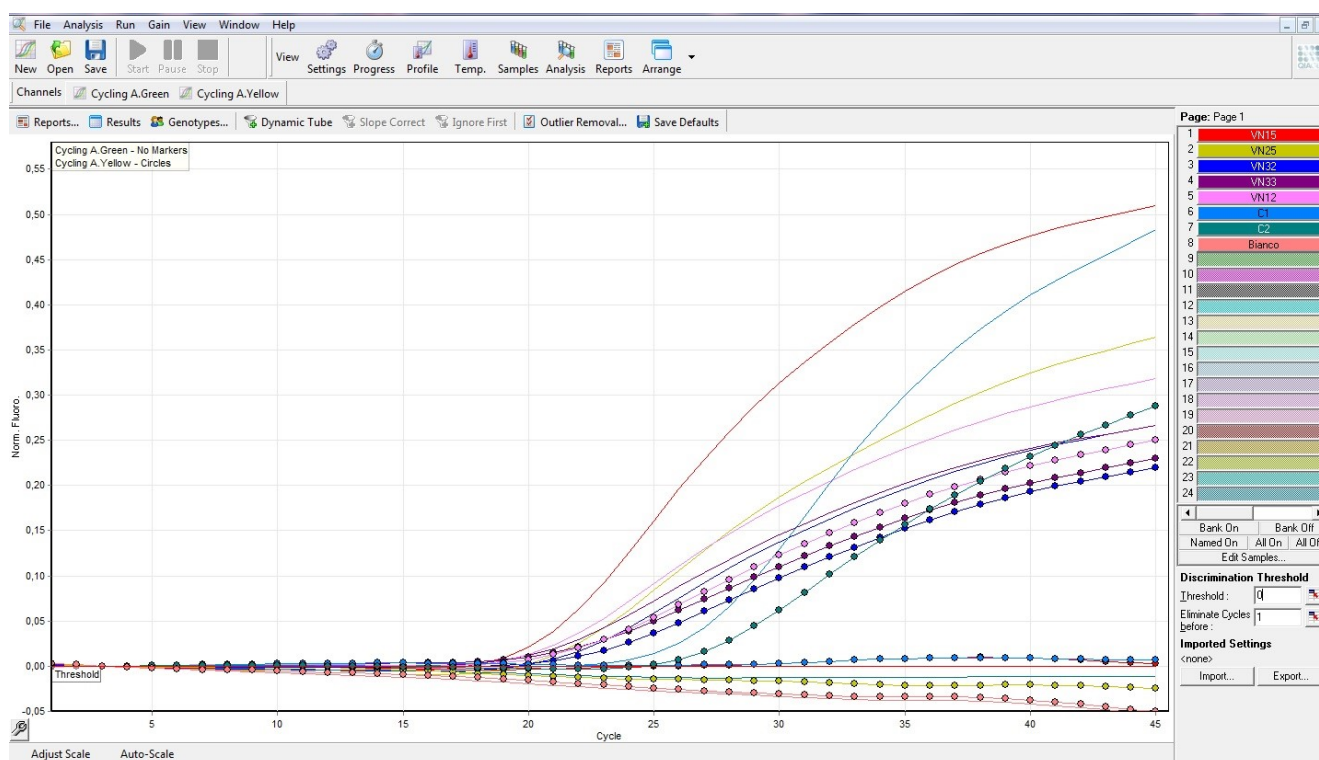


Fig.1

The background fluorescence depends on several factors not related to the kit, and its intensity may differ between different sessions of analysis. For this reason the main functions of Rotor-Gene®Q software are shown below, leaving to the operator the possibility to vary, within the limits described, the specific values of these functions (**Fig.2**).

- **Dynamic Tube:** this feature allows the normalization of fluorescence data. The level of the background average is calculated for each sample from cycle 1 to the output cycle (C_T). This function is set by default and is recommended to not disable it.
- **Slope Correct:** the background fluorescence of each sample increases progressively during the reaction cycles. This is mainly due to the chemistry used (Taqman probes) and can result in a growth of the basal fluorescence lines which could be translated into a non-specific signal if it crosses the threshold line. If this increase (slope) is observed, it is recommended to correct it by activating the *Slope Correct*.
- **Ignore first:** the fluorescence signal of the first reaction cycles may not be representative of the rest of the run. For this reason, in some cases is possible to get better results if the first few cycles are ignored. By selecting this function up to first 10 cycles of reaction can be skipped. To enable this feature, click *Ignore First* and indicate the

number of cycles to be ignored by selecting a number between 1 and 10.

- **Outlier removal – NTC Threshold:** This function allows to discriminate the real fluorescence signals from background noise. Clicking on *Outlier Removal* it is possible to select, for the NTC-Threshold function, a value comprised between 0 and 30%. For example, by setting 15% all the signals with an increase of fluorescence less than 15% compared to the maximum increase of fluorescence detected, will be considered non-specific and neutralized by the software. It is recommended not to use the underlying function "Reaction Efficiency Threshold" to avoid that some samples will be excluded from genotyping.

Once removed the background fluorescence it is possible to set the threshold values on the basis of the batch related *Data Sheet* attached to this manual (Fig.2).

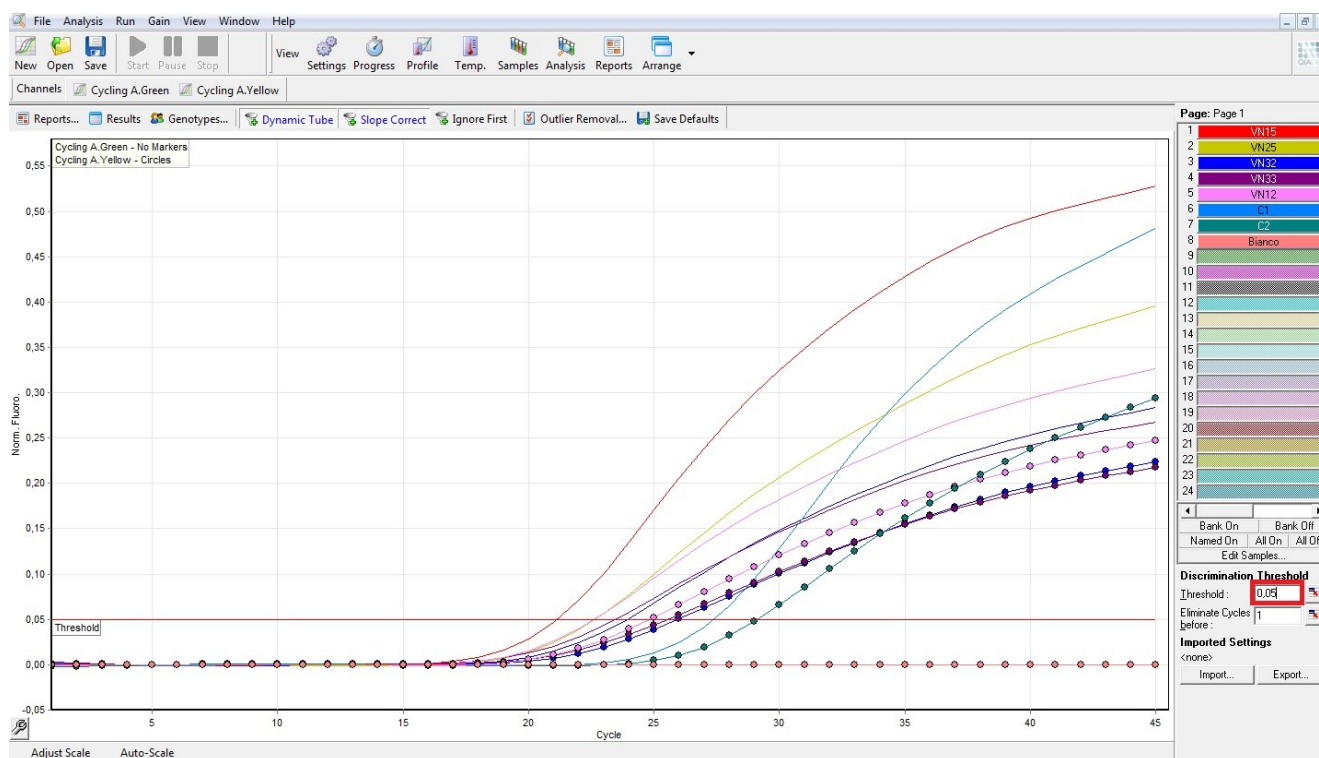


Fig.2

Once the threshold is set, check that **Control 1** is detected in **Green channel** and not detected in **Yellow channel**, whereas **Control 2** is detected in **Yellow channel** and not detected in **Green channel**. The **Reaction Blank** must not be detected in any channel.

If these three 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.

Therefore, if only a **FAM/Green signal** is detected the sample is **Homozygous Wild Type**, whereas if only a **HEX/Yellow signal** is detected the sample is **Homozygous Mutated**. Finally, if both **FAM/Green** and **HEX/Yellow** are detected the sample is **Heterozygous**.

Condition in which no signal is detected for samples or controls indicates PCR inhibition. In this case, refer to troubleshooting.

Result Interpretation Table

Green channel	Yellow channel	Results
Detected	Not detected	Wild Type
Not detected	Detected	Mutated
Detected	Detected	Heterozygous
Not detected	Not detected	Inhibition

Selecting all the samples it is possible to generate a report of all the data (**Fig.3**)

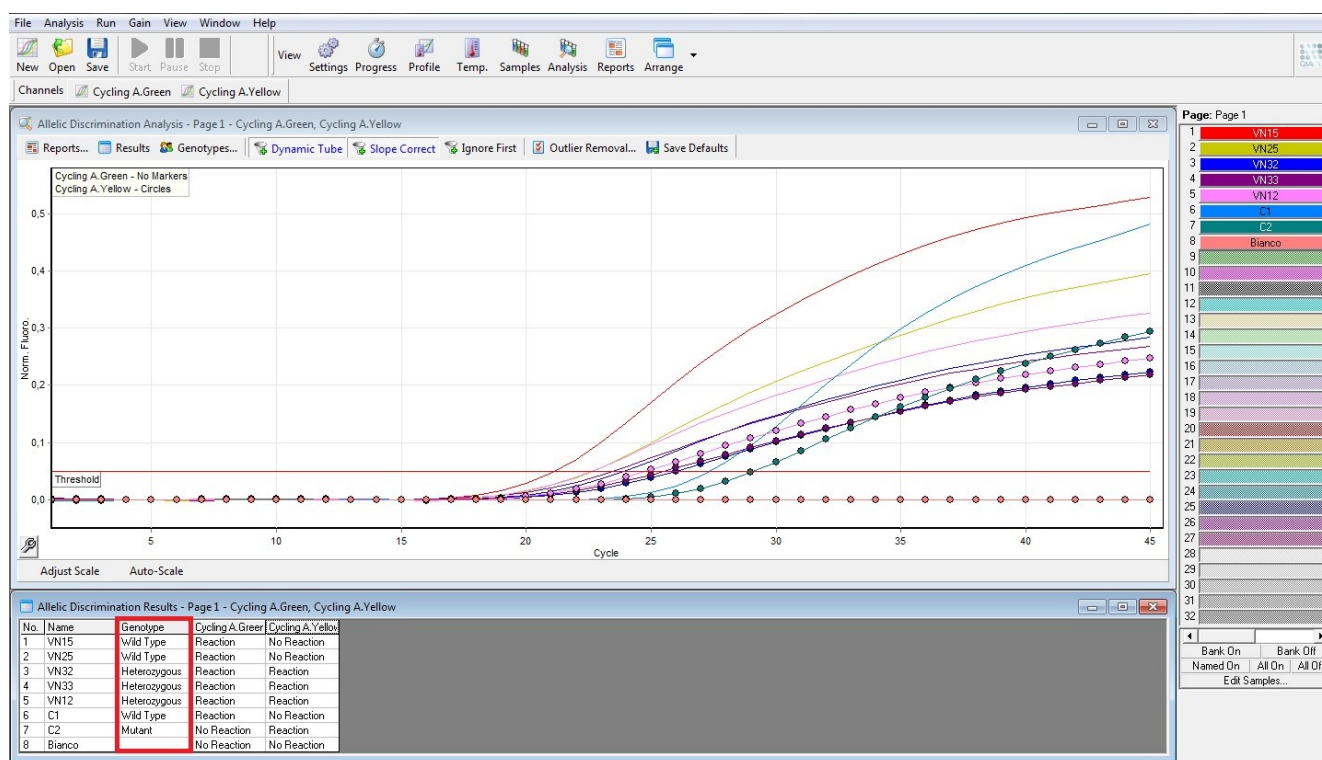


Fig.3

To generate a Report:

- Select all the samples and controls
- Click *Reports*, select *Allelic Discrimination Analysis* and then *Show*

Additionally, **Scatter Plot Analysis** can be used to visualize the results. In this analysis each sample is identified by a spot representing the end-point fluorescence values for the two dyes (**Fig.4**).

- In the *Analysis* menu select *Other*
- Select *Scatter Graph Analysis*, highlight both *Green* and *Yellow* channels and press *Show* to display the scatter plot. The scatter plot is divided in four areas corresponding to samples classified as Wild Type, Mutant, Heterozygous.
- In the *Scatter Analysis graph* window that appears select with the mouse the area corresponding to a specific Genotype and name it as show in the figure below (*Green* → *Wild-type*; *Yellow* → *Mutated*; and *Green/Yellow* → *Heterozygous*)

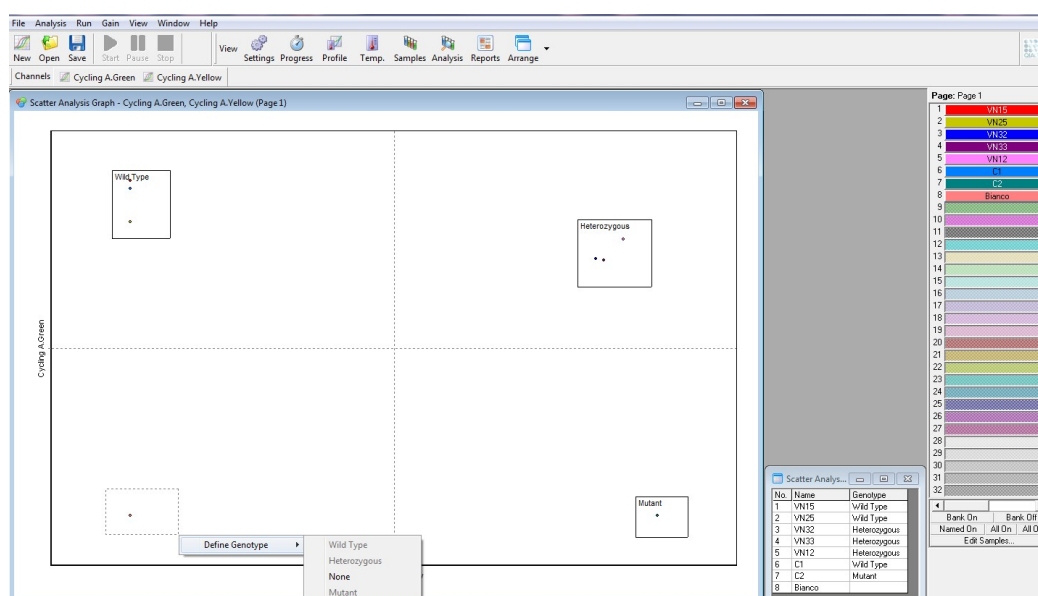


Fig.4

TROUBLESHOOTING

Problem 1: Weak or no signal of unknown samples.

1. The PCR was inhibited:
 - Make sure to follow to the manufacturer's instructions for DNA purification
2. The reagents storage conditions did not comply with the instructions:
 - Check the storage conditions.
3. Improper DNA extraction:
 - Repeat analysis starting from the DNA extraction stage
4. Very low starting amount and/or low purity of genomic DNA. Improper DNA extraction or sample storage:
 - Check sample (blood and extracted DNA) storage conditions
 - Repeat DNA purification
5. Wrong channel/filter was chosen:
 - Check fluorescence channels reported in this manual.

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: Signal in Yellow channel in C1 and/or in Green channel in C2.

1. Contamination during DNA extraction procedure. All samples results are INVALID:
 - Decontaminate all surfaces and instruments with sodium hypochlorite (0,5%) and ethanol (70%) or special DNA decontamination reagents
 - In case of manual procedure: Use only filter tips during the extraction procedure. Change tips between tubes
 - Repeat the DNA extraction with the new set of reagents.

Problem 4: Any signal with Reaction Blank (BM).

1. Contamination during PCR preparation procedure. All samples results are INVALID:
 - Decontaminate all surfaces and instruments with sodium hypochlorite (0,5%) and ethanol (70%) or special DNA decontamination reagents
 - Pipette the Positive controls at last
 - Repeat the PCR preparation with the 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 the 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.



Duplica^{RealTime} Beta-Fibrinogen 455G>A Genotyping Kit

REV. EER049050_IFU_REV.01D_ENITA

REF : EER049050-50 test

Istruzioni Per l'Uso

FINALITA' D'USO

Duplica^{RealTime} Beta-Fibrinogen 455G>A Genotyping Kit è un test *in vitro*, basato sulla amplificazione degli acidi nucleici, per la rilevazione della variante allelica 455G>C nella regione promotore del gene umano che codifica per il Beta-Fibrinogeno, in DNA genomico purificato da sangue periferico raccolto in EDTA.

INTRODUZIONE

L'aumento dei livelli plasmatici di fibrinogeno è stato identificato come un indicatore di rischio per infarto miocardico, ictus e trombosi. Sia fattori ambientali che genetici danno un importante contributo ai livelli di fibrinogeno del plasma nell'uomo. Il Fibrinogeno (Fattore I) è una glicoproteina, sintetizzata nel fegato, che partecipa nella cascata della coagulazione. Il Fibrinogeno viene convertito in fibrina in presenza di trombina. Elevati livelli di fibrinogeno sono stati associati con un aumentato rischio per l'aterosclerosi e trombosi venosa profonda così come per le malattie cardiovascolari. Dal punto di vista strutturale, il fibrinogeno è composto da tre coppie di catene polipeptidiche (denominate α , β e γ) che sono collegate da ponti disolfuro. Queste tre catene sono codificate da tre diversi geni (α , β e γ rispettivamente), che si trovano sul cromosoma 4.

Tra i fattori genetici, un polimorfismo comune G $\rightarrow$ A in posizione - 455 nella regione del promotore del gene del Beta-Fibrinogeno è stata associata con livelli plasmatici di fibrinogeno elevati (per i portatori omozigoti AA).

PRINCIPIO DEL TEST

Duplica^{RealTime} Beta-Fibrinogen 455G>A Genotyping Kit è stato disegnato per riconoscere il polimorfismo 455G>A nel promotore del gene codificante per il Beta-Fibrinogeno.

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} Beta-Fibrinogen 455G>A Genotyping Kit** è basato su 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 la sonda che va a rilevare l'allele Mutato, porta 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

Il kit è stato realizzato per poter eseguire 50 reazioni, questo formato permette di eseguire 2 sessioni che includono: **25 campioni, 1 Controllo Wild Type (Controllo 1, C1), 1 Controllo Mutato (Controllo 2, C2) e 1 Bianco di Reazione (BM)** ciascuna.

Componenti del kit

<i>Reagenti</i>	<i>Codice Colore</i>	<i>Conservazione (range, °C)</i>	<i>Volume (µl)</i>	<i>Quantità (tubi)</i>
Oligo Mix (OM)*	Tappo Verde	-22÷-18	600	1
Amplification Mix (AM)	Tappo Blu	-22÷-18	600	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 STABILITA'

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 per estrazione del DNA (fare riferimento alla sezione specifica del relativo manuale d'uso)
- Guanti senza polvere usa e getta e camice di laboratorio
- Micropipette (5-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)
- Puntali con filtro DNase/RNase-free
- Rack per tubi
- Centrifuga da banco
- PCR box
- Tubi in polipropilene per Real Time PCR
- Frigorifero
- Congelatore
- Termociclatore per Real Time PCR **Rotor-Gene®Q** (Qiagen)

Tutta la strumentazione deve essere mantenuta regolarmente, in accordo con le istruzioni del produttore, e calibrata 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
- Se richiesto, Clonit offre 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%
- Usare guanti senza talco ed evitare di lasciare impronte o scrivere sulle parti ottiche dei tubi/micropiastre
- 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 l'estrazione di DNA Genomico da campioni di sangue intero (volume estrazione 200µl), Clonit raccomanda:

- l'utilizzo della piattaforma automatica **QIAasymphony®SP** (Qiagen). Per la procedura di estrazione seguire il protocollo riportato sul manuale d'uso della strumentazione (**QIAasymphony DNA mini kit, Qiagen**), utilizzando 200µl di sangue intero in 200µl di Elution Buffer.

- l'utilizzo della piattaforma automatica **Duplica®PREP Automatic Extractor** (ref. EDI001) con kit Duplica Blood DNA (ref. EDI002250) o Duplica NA Body Fluid (ref. EDI004200).

Nel caso di estrazione/purificazione manuale:

- Fasts 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! Usare solo campioni di sangue intero raccolti in EDTA.

Conservazione e qualità del DNA Purificato

Il DNA genomico purificato può essere tenuto a 2÷8°C se si prevede un suo utilizzo entro le 24-72 ore, nel caso di conservazioni prolungate tenerlo a -20°C (o -80°C).

b) Programmazione del termociclatore Rotor-Gene®Q

- Avviare il programma e selezionare *Advanced* nella finestra *New Run*
- Selezionare *new template* in *Empty Run* oppure un template già esistente
- Selezionare il Tipo di Rotore dello strumento in uso e poi *Next*
- Indicare l'operatore, il campione e il volume finale di reazione (**25 µl**) e poi *Next*
- Selezionare *Edit Profile* nel *New Run Wizard* e impostare il Profilo Termico come indicato in tabella
- Selezionare *Gain Optimisation* nel *New Run Wizard*
- In *Channel Settings* selezionare *Acquiring Channels* e premere *Add*
- Impostare i seguenti parametri per i canali Green e Yellow: tube position "1", target sample range "da 5 FI a 10FI", gain range "da -10 a 10"
- Attivare la funzione *Perform Optimisation before 1st acquisition*
- Chiudere la finestra e selezionare *Next*, infine *Start Run*.

N.B.: al termine di questa procedura si consiglia di salvare il file come "Template". In questo modo è possibile salvare le impostazioni del Profilo Termico e della Gain Optimisation e richiamarle nelle successive run.

Profilo Termico.

Tempo	Temperatura	Cicli
10 min	95°C	1
20 sec	95°C	45
30 sec	60°C	Acquisizione Fluorescenza canali <i>Green</i> e <i>Yellow</i>

c) Preparazione della PCR mix

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

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

Terminata la preparazione, aliquotare **20µl** della **Master Mix** nelle provette per PCR e aggiungere in ognuna **5µl** di **DNA estratto** o dei **controlli**; disporre le provette all'interno dello strumento e avviare il programma di amplificazione precedentemente impostato. Al termine del protocollo di amplificazione, rimuovere le provette dal termociclatore.

d) ANALISI ed INTERPRETAZIONE dei RISULTATI

La fluorescenza di ogni canale indica l'ibridazione di una sonda specifica per un allele: il **Canale Green** per la **sonda dell'Allele Wild Type (fluoroforo FAM)**, mentre il **Canale Yellow** per la **sonda dell'Allele Mutato (fluoroforo HEX)**. Se un campione mostra fluorescenza in **Green**, il campione ha un **Allele Wild Type**. Se il campione mostra fluorescenza in **Yellow**, il campione ha un **Allele Mutato**.

I risultati sono interpretati attraverso l'analisi del ciclo soglia (Threshold Cycle, C_T) per ciascun campione, utilizzando il metodo di analisi **"Allelic Discrimination"**

Il ciclo soglia è definito come il ciclo, a livello del quale, la curva di amplificazione interseca la linea soglia (Threshold line). Durante i primi cicli di amplificazione della PCR viene calcolata la fluorescenza di background utilizzata poi per il calcolo della fluorescenza basale.

Per l'elaborazione dei risultati sulla piattaforma Rotor-Gene®Q procedere secondo le seguenti indicazioni:

- Cliccare *Analysis* dal menù della barra degli strumenti, cliccare quindi *Allelic Discrimination*
- Selezionare i 2 canali di lettura: Cycling A.Green e Cycling A.Yellow tenendo premuto il tasto SHIFT della tastiera
- Cliccare *Show*

Vengono ora mostrati, per ciascun campione, i dati di fluorescenza combinati (**Fig.1**): la **linea continua** rappresenta il segnale di fluorescenza in **Green (Allele Wild Type)** e la **linea con circoletti** il segnale di fluorescenza in **Yellow (Allele Mutato)**. Prima di impostare il valore della threshold e ottenere così la genotipizzazione dei campioni, è opportuno ottimizzare i dati di fluorescenza utilizzando le opzioni di normalizzazione del segnale e di riduzione del background di fluorescenza offerte dal software. L' utilizzo di queste funzioni permette di eliminare eventuali segnali non specifici.

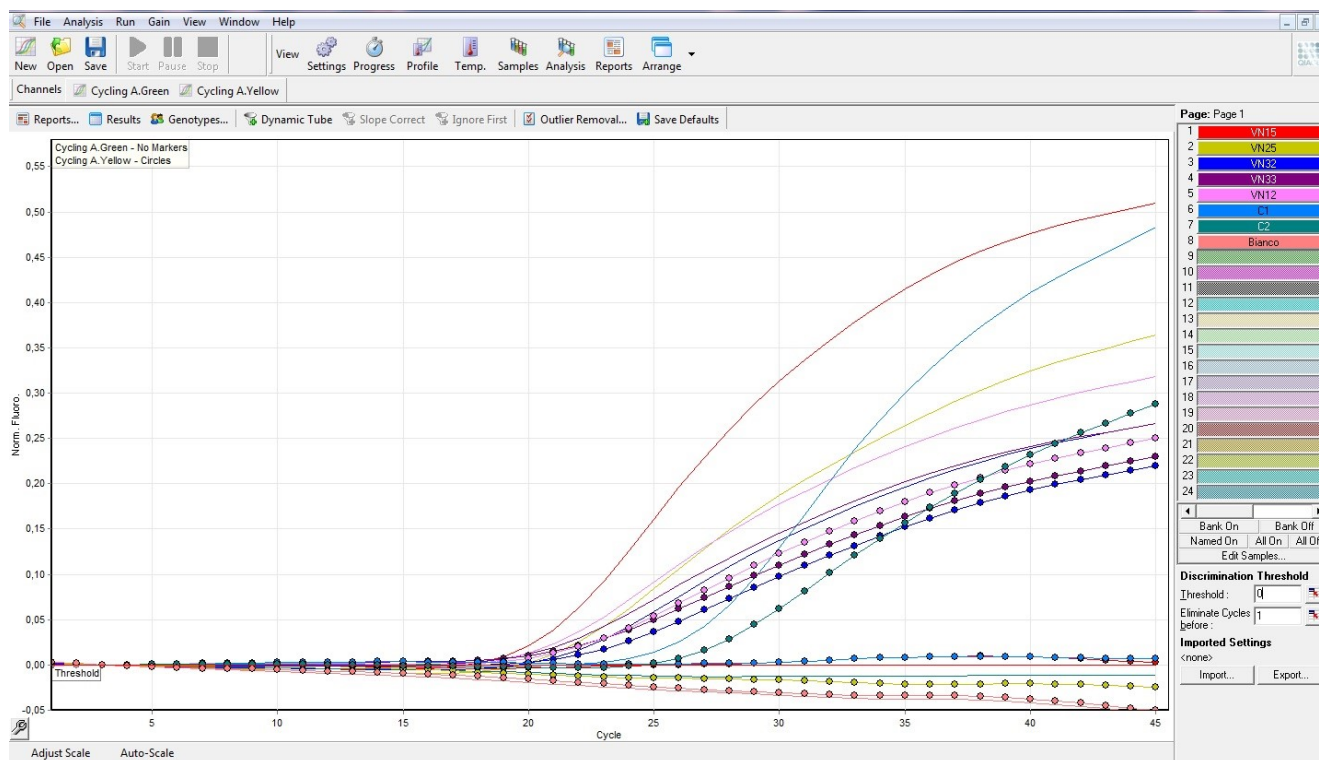


Fig.1

Il background di fluorescenza dipende da diversi fattori indipendenti dal kit e la sua intensità può differire fra sedute di analisi successive. Per questo motivo vengono qui di seguito illustrate le principali funzioni utilizzabili con il software Rotor-Gene®Q, lasciando all'operatore la possibilità di variare, entro i limiti descritti, gli specifici valori di tali funzioni (**Fig.2**).

- **Dynamic Tube:** questa funzione permette la normalizzazione dei dati di fluorescenza. Il livello di background medio viene calcolato per ciascun campione a partire dal ciclo 1 fino al ciclo di uscita (C_T). Questa funzione è impostata di default ed è sconsigliato disattivarla.
- **Slope Correct:** il background di fluorescenza di ciascun campione aumenta progressivamente durante i cicli di reazione; ciò è dovuto essenzialmente alla chimica utilizzata (sonde Taqman). Questo può determinare una tendenza di crescita delle linee basali di fluorescenza che si potrebbe tradurre in un segnale non specifico se venisse intersecata la linea di threshold. Qualora si osservasse questa tendenza, è consigliabile correggerla attivando la funzione *Slope Correct*.
- **Ignore first:** il segnale di fluorescenza dei primi cicli di reazione potrebbe non essere rappresentativo del resto della corsa. Per questa ragione, in alcuni casi, si possono ottenere migliori risultati se i primi cicli vengono ignorati. Selezionando questa funzione è possibile ignorare fino ai primi 10 cicli della reazione. Per attivare questa funzione, cliccare su *Ignore First* e indicare il numero di cicli da ignorare, selezionando un numero compreso fra 1 e 10.
- **Outlier removal – NTC Threshold:** questa funzione permette di discriminare i veri segnali di fluorescenza dal rumore di fondo. Cliccando su *Outlier Removal* è possibile selezionare, per la funzione NTC-Threshold, un valore compreso fra 0 e 30%. Indicando ad es. 15%, verranno considerati non specifici, e portati a zero, tutti i segnali con un incremento di fluorescenza minore del 15% rispetto all'incremento maggiore di fluorescenza calcolato in ogni tubo di reazione. È consigliato non utilizzare la sottostante funzione "Reaction Efficiency Threshold" per evitare che alcuni campioni vengano esclusi dalla genotipizzazione.

Una volta eliminato il background di fluorescenza è possibile impostare la threshold sulla base dei valori lotto specifici riportati nel *Data Sheet* al presente manuale (Fig.2)

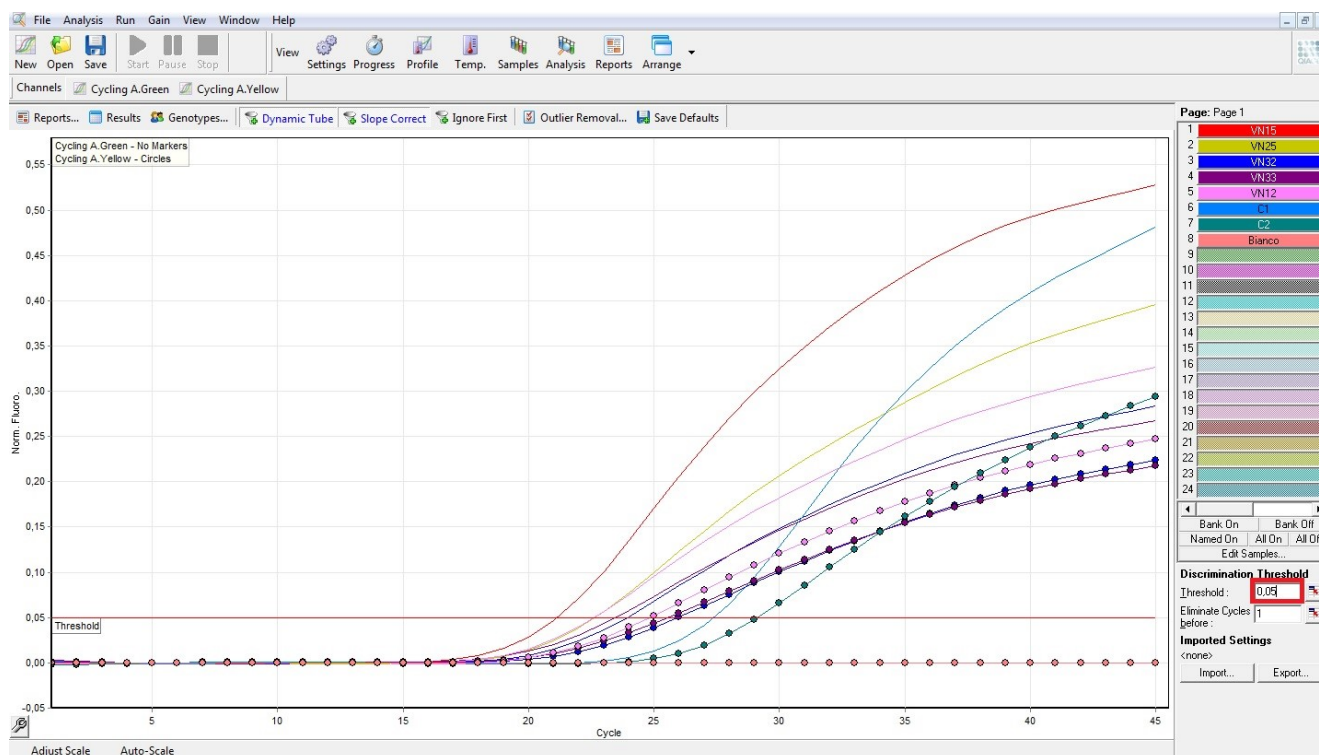


Fig.2

Dopo la corsa, la linea soglia deve essere impostata affinché: **il Controllo 1 risulti positivo in Green e negativo in Yellow, mentre il Controllo 2 risulti positivo in Yellow e negativo in Green. Il Bianco di Reazione deve essere negativo sia nel canale Green che nel canale Yellow.**

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

Se viene rilevato solo il **segnale FAM/Green** il campione é **Omozigote Wild Type**; mentre se viene rilevato solo il **segnale HEX/Yellow** il campione é **Omozigote Mutato**. Infine, se sono rilevati sia **FAM/Green** che **HEX/Yellow** il campione é **Eterozigote**.

La PCR risulta inibita se non viene rilevato nessun segnale nei campioni o controlli. In questo caso fare riferimento alla sezione Troubleshooting.

Interpretazione dei risultati

Canale Green	Canale Yellow	Risultato
Rilevato	Non Rilevato	Wild Type
Non Rilevato	Rilevato	Mutato
Rilevato	Rilevato	Eterozigote
Non rilevato	Non Rilevato	Inibizione

Selezionando tutti i campioni è possibile generare un referto con tutti i dati (**Fig.3**)

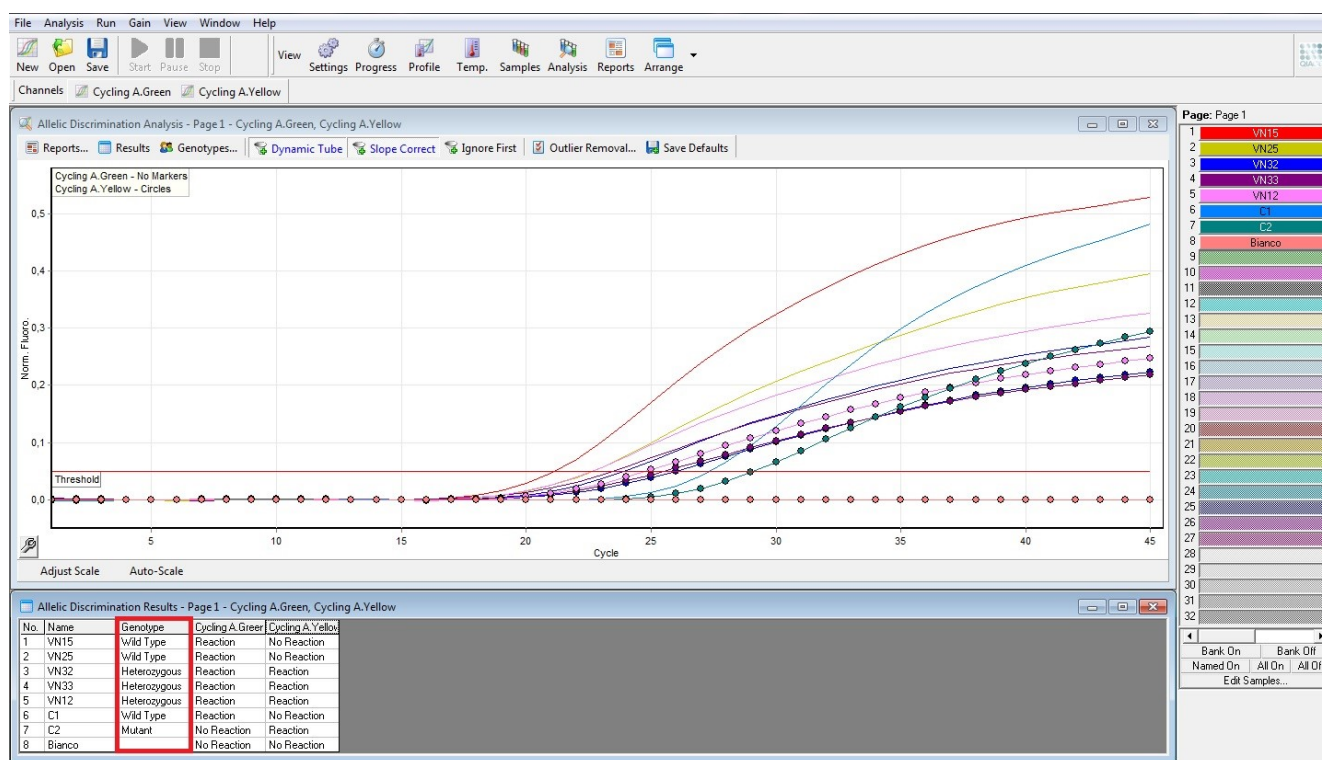


Fig.3

Per generare il Referto (report) della seduta di analisi:

- Selezionare tutti i campioni e i controlli
- Cliccare *Reports*, selezionare *Allelic Discrimination Analysis* e poi *Show*

È inoltre possibile utilizzare l'**analisi Scatter Plot** per visualizzare i risultati ottenuti. In questo tipo di analisi ogni campione è identificato da un punto che rappresenta il valore finale di fluorescenza (end-point) per i due fluorofori (**Fig.4**).

- Nel menu *Analysis* selezionare *Other*
- Selezionare *Scatter Graph Analysis*, evidenziare entrambi i canali *Green* e *Yellow* e premere *Show* per visualizzare lo Scatter Plot. Il grafico Scatter plot è suddiviso in quattro aree rappresentanti i campioni classificati come Wild Type, Mutati, Eterozigoti e Non Amplificati
- Nella finestra *Scatter Analysis graph* selezionare con il mouse l'area corrispondente a uno specifico genotipo e denominarlo come è mostrato nella figura che segue (*Green* → *Wild-type*; *Yellow* → *Mutated*; e *Green/Yellow* → *Heterozygous*)

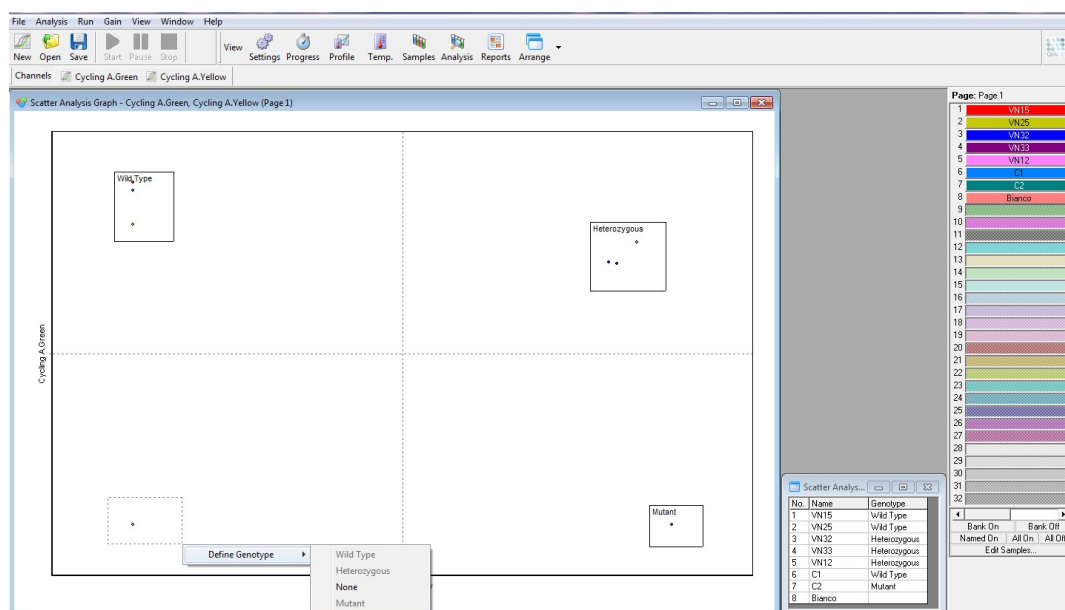


Fig.4

TROUBLESHOOTING

Problema 1: Segnale debole o assente nei campioni.

1. La PCR è stata inibita:
 - Assicurarsi di seguire le istruzioni del produttore del metodo di estrazione del DNA.
2. Le condizioni di stoccaggio dei reagenti non sono conformi alle istruzioni:
 - Verificare le condizioni di conservazione.
3. Estrazione del DNA impropria:
 - Ripetere l'analisi a partire dall'estrazione del DNA.
4. Quantità di DNA insufficiente e/o di bassa purezza. Estrazione di DNA inefficiente:
 - Controllare le condizioni di conservazione dei campioni (sangue intero o DNA estratto).
 - Ripetere la purificazione del DNA
5. Selezione del canale/filtro sbagliato:
 - Controllare i canali di fluorescenza indicati in questo manuale.

Problema 2: Segnale debole o assente del Controllo Wild Type (C1) e/o del 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:
 - Verificare le condizioni di conservazione.

Problema 3: Segnale Yellow in C1 o Green in C2.

1. Contaminazione durante la procedura di estrazione del DNA. Tutti i risultati sono da considerarsi INVALIDI:
 - Decontaminare tutte le superfici e gli strumenti con ipoclorito di sodio (0,5%) e etanolo (70%) o reagenti specifici per la decontaminazione di DNA
 - In caso di procedura manuale: Usare solo puntali con filtro durante la procedura di estrazione. Cambiare puntali per ogni tubo
 - Ripetere l'estrazione del DNA utilizzando un nuovo set di reagenti.

Problema 4: Qualsiasi segnale nel Bianco di Reazione (BM).

1. Contaminazione durante la procedura di preparazione della PCR. Tutti i risultati sono da considerarsi INVALIDI:
 - Decontaminare tutte le superfici e gli strumenti con ipoclorito di sodio (0,5%) e etanolo (70%) o reagenti specifici per la decontaminazione di DNA
 - Manipolare il Controllo Positivo solo alla fine
 - Ripetere l'estrazione del DNA 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 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 d'uso dello strumento o contattare il supporto tecnico locale.

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

