

MutaPLATE[®] Faktor II (TM)

Real-Time-PCR-Kit

*Für die Analyse der G20210A-Mutation
in der 3'-UTR-Region des Prothrombin-Gens
(humaner Gerinnungsfaktor II)*

*For the analysis of the G20210A mutation
within the 3' UTR region of the prothrombin gene
(human coagulation factor II)*

Gültig ab / Valid from 2022-03-04



KF1901632
KF1901696



32/96



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1	VERWENDUNGSZWECK	2
2	EINLEITUNG	2
3	TESTPRINZIP	2
4	INHALT DER TESTPACKUNG	3
5	ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
6	TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT	3
7	WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN	4
8	PROBENMATERIAL	5
9	REAL-TIME-PCR	5
	9.1 <i>Wichtige Hinweise vor Beginn</i>	5
	9.2 <i>Durchführung</i>	5
	9.3 <i>Geräteeinstellungen</i>	6
10	ANALYSE DER ERGEBNISSE	7
11	PROBLEMBEHANDLUNG	8
12	GRENZEN DES TESTS	9
13	ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	9
14	LITERATUR	10

1 VERWENDUNGSZWECK

Der MutaPLATE® Faktor II (TM) Real-Time-PCR-Kit ist ein molekularbiologischer Test zum Nachweis der G20210A-Mutation innerhalb der 3' UTR-Region des Prothrombin-Gens (humaner Gerinnungsfaktor II) in offenen Real-Time PCR-Systemen (z. B. RotorGene, SmartCycler, Light Cycler, ABI, Stratagene, Amplifa) mittels Taq-Man-Technologie. Diese Mutation steht im Zusammenhang mit einer großen Menge an Prothrombin im Plasma.

2 EINLEITUNG

Prothrombin (Faktor II) ist ein Protein im Blut, das für die Blutgerinnung erforderlich ist. Blutgerinnsel bestehen aus einer Kombination von Blutplättchen und einem Geflecht aus dem Blutgerinnungsprotein Fibrin. Prothrombin als Blutgerinnungsprotein wird zur Bildung von Fibrin benötigt. Personen mit zu wenig Prothrombin haben eine Blutungsneigung. Wenn eine Person zu viel Prothrombin hat, können sich Blutgerinnsel bilden, obwohl sie es nicht sollten. [1], [2], [3]

Polymorphismus	RsNummer	Effekt		
		Wildtyp	Heterozygote Mutation	Homozygote Mutation
G20210A	rs1799963	Normaler Prothrombin-Spiegel	Mittlere Zunahme des zirkulierenden Prothrombinspiegels verbunden mit erhöhter Thrombin-Bildung. Anfällig für venöse Thrombose.	Starker Anstieg des zirkulierenden Prothrombinspiegel verbunden mit erhöhter Thrombin-Bildung. Anfällig für venösen Thrombose.

3 TESTPRINZIP

Das MutaPLATE® Faktor II (TM) Real-Time-PCR-Kit enthält spezifische Primer und Zusatzmaterial für den Nachweis des G20210A-Polymorphismus des Prothrombin-Gens. Der variable Bereich des Prothrombin-Gens wird mittels PCR unter Verwendung einer genomischen DNA-Template amplifiziert.

Die Standard-PCR enthält zusätzlich zwei sequenzspezifische Oligonukleotide die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind (TaqMan-Sonden). Beide Sonden bin-

den an die amplifizierte Ziel-DNA, die den Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) enthält. Hierdurch wird ein Fluoreszenzsignal erzeugt und von der optischen Einheit des verwendeten Real-Time-PCR-Gerätes erfasst. Die TaqMan-Sonde für das G-Allel (Wildtyp) ist mit **FAM** markiert (**510 nm, grün**), die TaqMan-Sonde für das A-Allel (Mutation) ist mit **YAK** (**555 nm, gelb**) markiert.

4 INHALT DER TESTPACKUNG

Die mitgelieferten Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 32 (KF1901432) oder 96 (KF1901496) Reaktionen.

Tabelle 1: Inhalt des MutaPLATE® Faktor II (TM) Real-Time-PCR-Kits.

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt	
		32	96
Enzymmix	blau	1 x 438 µl	3 x 438 µl
Detektionsmix	gelb	1 x 368 µl	3 x 368 µl
Positive Kontrolle	rot	1 x 15 µl	1 x 45 µl
Negative Kontrolle	grün	1 x 150 µl	1 x 150 µl

5 ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- DNA-Extraktionskit (z. B. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038)
- Offenes Real-Time-PCR-System (mit Platten/Streifen oder Tubes)
- Sterile PCR Reaktionsgefäße oder 96-well Platten/Streifen (weiß)
- Sterile Reaktionsgefäße
- Kalibrierte Pipetten (variable Volumina) und sterile Einweg-Spitzen mit Filter
- optional: Pipettiergeräte zur Automation

6 TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT

Der Transport des MutaPLATE® Faktor II (TM) Real-Time-PCR-Kits erfolgt gefroren auf Trockeneis oder Kühlakkus. Alle Komponenten sind direkt nach Erhalt lichtgeschützt bei mindestens -20°C zu lagern. Mehrfache Frier-Auftau-Zykeln sind zu vermeiden (wenn nötig, Aliquots herstellen). Nach Ablauf des auf der Packung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.

Schützen Sie die Detektionsmische unbedingt während der gesamten Testlaufzeit vor direkter Sonneneinstrahlung.

7 WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Lesen Sie die Gebrauchsanweisung sorgfältig durch, bevor Sie das Produkt verwenden.

- Alle Proben müssen als potentiell infektiös und/oder biogefährdend betrachtet werden und alle mit den Proben in Berührung kommenden Gegenstände müssen als potentiell kontaminiert erachtet werden.
- Die Real-Time-PCR muss in für diesen Zweck geeigneten Laboratorien und von speziell geschultem Personal durchgeführt werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Areale für die Probenvorbereitung und den Ansatz des PCR-Master-Mix sollten strikt getrennt sein.
- Pipetten, Röhrchen und andere Arbeitsmaterialien dürfen nicht von einem Bereich in den anderen zirkulieren.
- Immer Pipettenspitzen mit Filtern verwenden.
- Bei Verwendung der Kitkomponenten sind stets puderfreie Einmal-schutzhandschuhe zu tragen.
- Pipetten und Arbeitsflächen regelmäßig mit geeigneter Dekontaminationslösung reinigen (keine ethanolhaltigen Mittel).
- Kontaminationen der Eluate und Kitkomponenten mit Mikroben oder Nukleasen (RNAsen und DNAsen) sind zu vermeiden.
- Positives und potentiell positives Material muss stets von allen anderen Kitkomponenten separiert bleiben.
- Reaktionsgefäße/Platten nach der Amplifikation nicht öffnen, um Verunreinigungen zu vermeiden.
- Gemäß Richtlinien oder Anforderungen lokaler, staatlicher oder bundesstaatlicher Vorschriften oder bevollmächtigter Organisationen können zusätzliche Kontrollen getestet werden.
- Reaktionsgefäße nach der PCR nicht autoklavieren, da dies die amplifizierte Nukleinsäure nicht degradieren wird und das Risiko beinhaltet, den Laborbereich zu kontaminieren.
- Entsorgen Sie die Proben und Testabfälle gemäß Ihrer örtlichen Sicherheitsvorschriften.

- Alle PCR-Reagenzien während des Arbeitens kühlen.
- Die Reinheit (A260/A280) der genomischen DNA sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen

8 PROBENMATERIAL

Das Ausgangsmaterial für den MutaPLATE® Faktor II (TM) Real-Time-PCR-Kit ist genomische DNA, die mittels eines geeigneten Extraktionskits aus klinischen Proben (Blut) isoliert wurde.

9 REAL-TIME-PCR

9.1 Wichtige Hinweise vor Beginn

- Bitte beachten Sie Kapitel 7 („Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen“).
- Bevor Sie die PCR ansetzen, machen Sie sich mit dem Real-Time-PCR-Gerät vertraut.
- Die Programmierung des Temperaturprofils sollte abgeschlossen sein, bevor die PCR angesetzt wird.
- Beachten Sie, dass in jedem PCR-Lauf alle Positivkontrollen sowie eine Negativkontrolle enthalten sein sollte.
- Vor jedem Gebrauch müssen alle Reagenzien schonend aufgetaut, gründlich gemischt (nicht vortexen) und kurz anzentrifugiert werden.
- Die Detektionsmische vor Lichteinwirkung schützen.
- Wir empfehlen, die Reagenzien und den Ansatz während des Arbeiten stets in einem Kühlblock (+4 bis +8 °C) oder auf Eis zu kühlen.

9.2 Durchführung

Für die Amplifikation wird ein Reaktionsgefäß pro Probe und zwei zusätzliche Reaktionsgefäße für die negative und die positive Kontrolle benötigt. Die folgende Tabelle zeigt die zu pipettierenden Volumina pro Probe. Für die Analyse wird empfohlen ein Mastermix für die Anzahl an Proben (inkl. negativer und positiver Kontrollen) (N) plus 10 % herzustellen, um Ungenauigkeiten auszugleichen. Der Master Mix wird wie in Tabelle 2 beschrieben pipettiert:

Master Mix

Tabelle 2: Herstellung des Master Mix

Reagenz	Volumen pro 25 µl - Reaktionsansatz	Master-Mix-Volumen
Detektionsmix 1 (gelb)	10,5 µl	10,5 µl * (N + (N * 0,1))
Enzymmix (blau)	12,5 µl	12,5 µl * (N + (N * 0,1))

- Den Master Mix vorsichtig durch auf- und abpipettieren oder durch invertieren durchmischen und kurz anzentrifugieren.
- In jede Kapillare **23 µl** des Master Mix vorlegen.
- Für die negative Kontrolle **2 µl** von der mitgelieferten Negativen Kontrolle (**grün**) dazugeben.
- Für die positive Kontrolle **2 µl** von der mitgelieferten positiven Kontrolle (**rot**) dazugeben.
- Für die zu analysierenden Proben jeweils **2 µl** der extrahierten genomischen DNA in das entsprechende Reaktionsgefäß dazugeben.

9.3 Geräteeinstellungen

Nutzen Sie für die Real-Time-PCR das in Tabelle 3 beschriebene Temperaturprofil.

Tabelle 3: Real-Time-PCR-Temperaturprofil

Beschreibung	Dauer	Temperatur	Zyklen	Acquisition
Initiale Denaturierung	120 s	94 °C	1	keine
Denaturierung	30 s	94 °C	45	keine
Primer Anlagerung und Elongation	60 s	64 °C		Single
Kühlen	30 s	40 °C	1	-

10 ANALYSE DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Analyse für den G20210A Polymorphismus werden bei **510 - 530 nm / grün** und **555 - 560 nm / gelb** (entsprechend des verwendeten Real-Time-PCR-Gerätes) dargestellt.

Die folgenden Abbildungen zeigen typische Beispiele sowohl für homozygote als auch für heterozygote Proben auf einem LightCycler® 2.0. Bei einigen Real-Time-PCR-Geräten (z.B. LightCycler® 2.0) kann ein Color Compensation File erforderlich sein.

G-Allel bei 530 nm

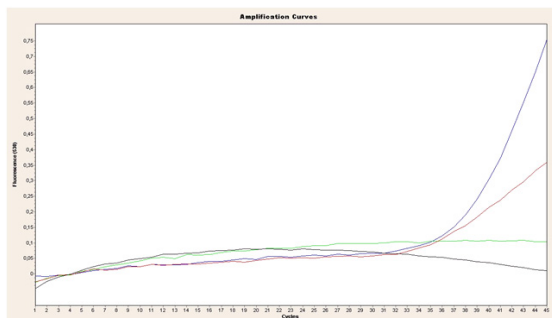


Abb. 1: Auswertung zu Faktor II G-Allel.

A-Allel bei 560 nm

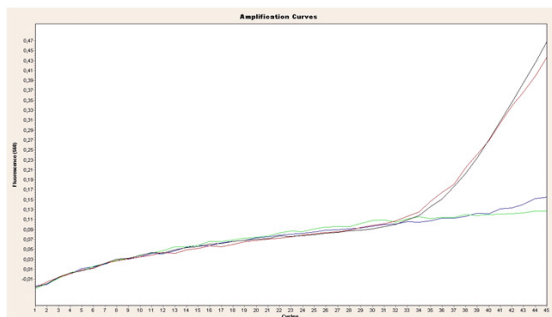


Abb. 2: Auswertung zu Faktor II A-Allel.

Die mitgelieferte Positive Kontrolle enthält ein Template, welches für den G20210A Polymorphismus **heterozygot** ist.

Für den Polymorphismen sind die folgenden drei Unterscheidungen möglich:

G20210A

1. Homozygot **G/G**:

Zunahme des Fluoreszenzsignals der **FAM**-markierten TaqMan-Sonde, kein Anstieg des Fluoreszenzsignals der **YAK**-markierten TaqMan-Sonde.

2. Heterozygot **G/A**:

Zunahme des Fluoreszenzsignals der **FAM**-markierten TaqMan-Sonde und Zunahme des Fluoreszenzsignals der **YAK**-markierten TaqMan-Sonde.

3. Homozygot **A/A**:

Kein Anstieg des Fluoreszenzsignals der **FAM**-markierten TaqMan-Sonde, Zunahme des Fluoreszenzsignals der **YAK**-markierten TaqMan-Sonde.

11 PROBLEMBEHANDLUNG

Folgende Problembeschreibung soll bei eventuell auftretenden Problemen mit der Real-Time-PCR behilflich sein. Sollten Sie weitere Fragen, haben wenden Sie sich bitte direkt an Immundiagnostik AG.

Keine Fluoreszenz bei der Positivkontrolle oder den Proben bei 510 nm - 530 nm oder 555 - 560 nm:

Überprüfung des PCR Programms des Real-Time-PCR Systems und Wiederholung der Analyse mit dem korrigierten Protokoll.

Der Detektions Mix wurde mehr als zwei Gefrierzyklen unterzogen oder wurde länger als vier Tage bei 2-8 °C gelagert. Wiederholen Sie die Analyse mit einem frischen Aliquot oder neuem Detektions Mix.

Die Qualität der Ausgangs-DNA ist nicht ausreichend. Nutzen Sie frisch extrahierte DNA und bestimmen Sie die Konzentration/Reinheit vor der Nutzung.

Der Detektions Mix wurden nicht vor Lichteinwirkung geschützt. Wiederholen Sie die Analyse mit einem frischen Aliquot oder neuen PCR Reagenzien.

Geringe Fluoreszenz bei der Positivkontrolle oder den Proben bei 510 nm - 530 nm oder 555 - 560 nm:

Einzelne Komponenten vor Gebrauch sorgfältig mischen (nur durch mehrmaliges pipettieren - nicht vortexen!

Alle Stammlösungen während der Arbeitsschritte in geeigneter Weise kühlen und die Detektionsmische vor Lichteinstrahlung schützen.

Auf Eis oder mit einem gekühlten Block (4 °C) arbeiten.









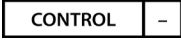





12 GRENZEN DES TESTS

Das Ergebnis wird dem behandelnden Arzt als unterstützendes Material zur Verfügung gestellt und sollte niemals ausschließlich zur Diagnostik oder zu Behandlungsempfehlungen herangezogen werden. Die Diagnose sowie die einzuleitenden Behandlungsentscheidungen bleiben in der vollen Verantwortung des Arztes.

Die Genauigkeit von genetischen Tests beträgt nicht 100 %. Es wurde jedoch eine Genauigkeit von über 98 % basierend auf den Validierungsdaten für diesen Test festgestellt. Weiterhin müssen Ergebnisse von genetischen Tests im Kontext der klinischen Repräsentation des Patienten sowie bekannten familiären Risiken im Umfeld des Patienten betrachtet werden.

Der Test analysiert nur eine Auswahl an Markern. Daher schließt ein negatives Testergebnis des Patienten ein Risiko jedweder Art nicht vollständig aus.

13 ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

DNA	Desoxyribonukleinsäure		Katalognummer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		Zu verwenden mit
	Enzymmix		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Detektionsmix		Obere Temperaturgrenze
	Positive Kontrolle		Hersteller
	Negative Kontrolle		Chargennummer
	Inhalt		Arbeitsanleitung beachten
	<i>In-vitro</i> Diagnostikum		Verwendbar bis JJJJ-MM-TT

14 LITERATUR

1. V. D. Stefano, I. Martinelli, P. M. Mannucci, K. Paciaroni, P. Chiusolo, I. Casorelli, E. Rossi und G. Leone, „The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation.“ N Engl J Med, Bd. 341, Nr. 11, pp. 801-806, 1999.
2. A. Gerhardt, R. E. Scharf, M. W. Beckmann, S. Struve, H. G. Bender, M. Pillny, W. Sandmann und R. B.Zotz, „Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium.“ N Engl J Med, Bd. 342, Nr. 6, pp. 374-380, 2000.
3. R. F. Franco, M. D. Trip, H. t. Cate, A. v. den, M. H. Prins, J. J. Kastelein und P. H. Reitsma, „The 20210 G-->A mutation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene and the risk for arterial thrombotic disease.“ Br J Haematol, Bd. 104, Nr. 1, pp. 50-54, 1999.

MutaPLATE[®] Faktor II (TM)

Real-Time-PCR Kit

*For the analysis of the G20210A mutation
within the 3' UTR region of the prothrombin gene
(human coagulation factor II)*

Valid from 2022-03-04



KF1901632
KF1901696



32/96



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1	INTENDED USE	15
2	INTRODUCTION	15
3	PRINCIPLE OF THE TEST	15
4	PACKAGE CONTENTS	16
5	EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER	16
6	TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY	16
7	WARNINGS AND PRECAUTIONS	16
8	SAMPLE MATERIAL	17
9	REAL-TIME-PCR	17
	9.1 <i>Important points before starting</i>	17
	9.2 <i>Procedure</i>	18
	9.3 <i>Instrument settings</i>	19
10	DATA ANALYSIS	19
11	TROUBLESHOOTING	20
12	LIMITATIONS OF THE METHOD	21
13	ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	21
14	LITERATURE	22

1 INTENDED USE

The MutaPLATE® Faktor II (TM) Real-Time PCR Kit is a molecular biological test for the detection of the G20210A mutation within the 3' UTR region of the prothrombin gene (human coagulation factor II) in open real time PCR systems (e. g. RotorGene, SmartCycler, Light Cycler, ABI, Stratagene, Amplifa) by Taq-Man technology. This mutation is related to a big amount of prothrombin in plasma.

2 INTRODUCTION

Prothrombin (Factor II) is a protein in the blood required for the blood to clot. Blood clots are composed of a combination of blood platelets and a meshwork of the blood clotting protein fibrin. Prothrombin as blood clotting protein is needed to form fibrin. Persons with too little prothrombin have a bleeding tendency. If an individual has too much prothrombin, blood clots may form when they shouldn't. [1], [2], [3]

Poly-morphism	RsNumber	Effect		
		Wildtype	Heterozygous mutation	Homozygous mutation
G20210A	rs1799963	Normal levels of prothrombin	Intermediate increase in circulating prothrombin levels associated with higher thrombin formation. Prone to venous thrombosis.	Strong increase in circulating prothrombin levels associated with higher thrombin formation. Prone to venous thrombosis.

3 PRINCIPLE OF THE TEST

The MutaPLATE® Faktor II (TM) Real-Time PCR Kit contains specific primers and additional material for the detection of the G20210A polymorphism of the prothrombin gene. The variable area of the prothrombin gene is amplified by PCR using genomic DNA-template.

The standard PCR contains additionally two sequence specific oligonucleotides marked with fluorescence dye (TaqMan probes). Both probes bind at the amplified target-DNA which includes the single nucleotide polymorphism (SNP). Due to

this, a fluorescence signal is generated and detected by the optical unit of the used real time PCR instrument. The TaqMan probe for the G-allele (wildtype) is marked with **FAM (510 nm, green)** and the TaqMan probe for the A-allele (mutation) is marked with **YAK (555 nm, yellow)**.

4 PACKAGE CONTENTS

The components supplied are sufficient for the preparation of 32 (KF1901632) or 96 (KF1901696) reactions.

Table 1: Components of the MutaPLATE® Faktor II (TM) Real-Time-PCR Kit .

Label	Lid Colour	Content	
		32	96
Enzyme mix	blue	1 x 438 µl	3 x 438 µl
Detection mix	yellow	1 x 368 µl	3 x 368 µl
Positive control	red	1 x 15 µl	1 x 45 µl
Negative control	green	1 x 150 µl	1 x 150 µl

5 EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER

- DNA extraction kit (e.g. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038)
- Open real-time PCR system (with plates/strips or tubes)
- Sterile PCR reaction tubes or 96-well plate/strips (white)
- Sterile reaction tubes
- Calibrated pipettes (variable volumes) and sterile disposable tips with filter
- Optional: Liquid handling system for automation

6 TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY

The MutaPLATE® Faktor II (TM) real-time PCR kit is transported frozen on dry ice or cool packs. All components are to be stored protected from light at a minimum of -20 °C immediately after receipt. Avoid multiple freeze-thaw cycles (make aliquots if necessary). Do not use after the expiry date indicated on the package.

Be sure to protect the detection mixes from direct sunlight during the entire test procedure.

7 WARNINGS AND PRECAUTIONS

Read the instructions for use carefully before using the product.

- All samples must be considered potentially infectious and/or biohazardous and all items that come into contact with the specimens must be considered potentially contaminated.
- Real-time PCR must be performed in laboratories suitable for this purpose and by specially trained personnel.
- The assay must always be carried out according to the instructions supplied with the kit.
- Areas for sample preparation and preparation of the PCR master mix should be strictly separated.
- Pipettes, tubes and other working materials must not circulate from one area to the other.
- Always use pipette tips with filters.
- Always wear powder-free disposable gloves when using the kit
- Clean pipettes and work surfaces regularly with suitable decontamination solution (no ethanol-containing agents).
- Contamination of eluates and kit components with microbes or nucleases (RNAs and DNAses) should be avoided.
- Positive and potentially positive material must be kept separate from all other kit components at all times.
- Do not open reaction tubes/plates after amplification in order to avoid contamination.
- In accordance with guidelines or requirements of local, state or federal regulations or authorised organisations, additional controls may be tested.
- Do not autoclave reaction tubes after PCR as this will not degrade the amplified nucleic acid and risks contaminating the laboratory area.
- Dispose of samples and test waste according to your local safety regulations.
- Refrigerate all PCR reagents while working.
- The purity (A260/A280) of the genomic DNA should be between 1.8 and 2.0.

8 SAMPLE MATERIAL

Starting material for the MutaPLATE® Faktor II (TM) real-time PCR kit is genomic DNA isolated from clinical samples (blood) using a suitable extraction kit.

9 REAL-TIME-PCR

9.1 *Important points before starting*

- Please pay attention to chapter 7 “Warnings and precautions”.

- Before setting up the Real-Time-PCR familiarise yourself with the Real-Time PCR instrument and read the user manual supplied with the instrument.
- The programming of the thermal profile should take place before the PCR set up.
- In every PCR run all Positive Controls and one Negative Control should be included.
- Before each use, all reagents must be gently thawed, thoroughly mixed (do not vortex) and briefly centrifuged.
- Protect the detection mixes from exposure to light.
- We recommend always cooling the reagents and the preparation in a cooling block (+4 to +8 °C) or on ice while working.

9.2 Procedure

For amplification, one reaction tube is needed per sample plus two additional reaction tubes for the negative and the positive control. The following tables show the volumes to be pipetted per sample. For the analysis it is recommended to prepare a master mix for the number of samples (incl. negative and positive control) (N) plus 10 % to compensate for inaccuracies. The master mixes are pipetted as described in tables 2 and 3:

Master mix

Table 2: Preparation of master mix

Reagent	Volume per 25 µl - reaction mix	Master mix volume
Detection mix (yellow)	10.5 µl	10.5 µl * (N + (N * 0.1))
Enzyme mix (blue)	12.5 µl	12.5 µl * (N + (N * 0.1))

- Mix the Master Mix carefully by pipetting up and down or by inverting and centrifuge briefly.
- Add **23 µl** of the Master Mix to each capillary.
- For the negative control add **2 µl** of the supplied negative control (green).
- For the positive control add **2 µl** of the supplied positive control (red).
- For each sample to be analysed, add **2 µl** of the extracted genomic DNA to the corresponding capillary.

9.3 Instrument settings

For the Real-Time-PCR use the thermal profile shown in table 4.

Table 4: Real-Time-PCR thermal profile

Description	Time	Temperature	Cycles	Acquisition
Initial Denaturation	120 s	94 °C	1	none
Denaturation	30 s	94 °C	45	none
Primer annealing and elongation	60 s	60 °C		single
Cooling	30 s	40 °C	1	-

10 DATA ANALYSIS

The results of the analysis for the **G20210A** polymorphisms are shown at **510-530 nm / green** and **550-560 nm / yellow** (corresponding to the Real-Time PCR instrument used).

The following figures show typical examples for both homozygous and heterozygous on a LightCycler® 2.0. With some real-time PCR devices (e.g. LightCycler® 2.0) a colour compensation file may be required.

G allele at 530 nm

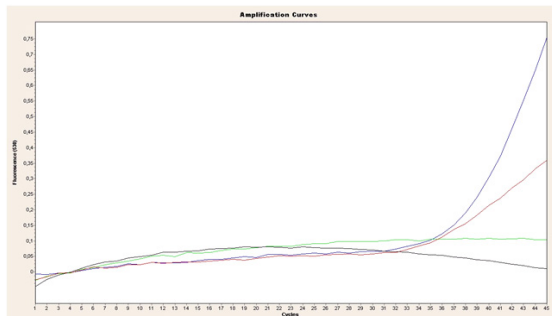


Fig. 1: Evaluation of G allele

A allele at 560 nm

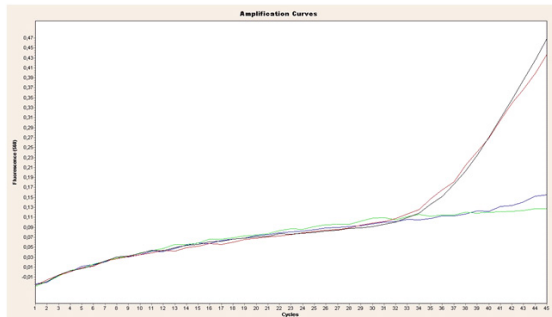


Fig. 2: Evaluation of A allele

The provided Positive Control (**red**) contains a template which is heterozygous for the G20210A-polymorphism (one allele carries the mutation, the other is wild type).

The following three discriminations are possible:

1. Homozygous **G/G**:

Increase of the fluorescent signal from the **FAM** labeled TaqMan probe, no increase of the fluorescent signal from the **YAK** labeled TaqMan probe.

2. Heterozygous **G/A**:

Increase of the fluorescent signal from the **FAM** labeled TaqMan probe and increase of the fluorescent signal from the **YAK** labeled TaqMan probe.

3. Homozygous **A/A**:

No increase of the fluorescent signal from the **FAM** labeled TaqMan probe, increase of the fluorescent signal from the **YAK** labeled TaqMan probe.

11 TROUBLESHOOTING

The following troubleshooting guide is included to help you with possible problems that may arise when performing a Real-Time-PCR. If you have further questions, please do not hesitate to contact our scientists on info@immundiagnostik.com.

No fluorescence peak in the positive control or samples at about 510 - 530 nm or 550 - 560 nm.

Check the PCR programme of the real-time PCR system and repeat the analysis with the corrected protocol.

Detection mixes have been subjected to more than two freeze cycles or have been stored at 2-8 °C for more than four days. Repeat the analysis with a fresh aliquot or new detection mix.

The quality of the starting DNA is not sufficient. Use freshly extracted DNA and determine the concentration/purity before use.

The detection mixes were not protected from light exposure. Repeat the analysis with a fresh aliquot or new PCR reagents.

Low fluorescence peak at about 510 - 530 nm or 555-560 nm

Mix individual components carefully before use (only by pipetting several times - do not vortex!).

Cool all stock solutions appropriately during the working steps and protect the detection mixes from light irradiation.

Work on ice or with a cooled block (4 °C).







12 LIMITATIONS OF THE METHOD









The result is provided to the treating physician as supporting material and should never be used exclusively for diagnosis or treatment recommendations. The diagnosis as well as the treatment decisions to be taken remain the full responsibility of the physician.

The accuracy of genetic tests is not 100%. However, it has been found to be over 98% accurate based on validation data for this test. Furthermore, genetic test results must be considered in the context of the patient's clinical representation and known familial risks in the patient's environment.

The test only analyses a selection of markers. Therefore, a negative test result of the patient does not completely exclude a risk of any kind.

13 ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

DNA	Deoxyribonucleic acid		Catalog number
PCR	Polymerase chain reaction		To be used with
	Enzyme mix		Contains sufficient for <n> test
	Detection mix		Upper limit of temperature

	Positive control		Manufacturer
	Negative control		Lot number
	Content		Consult instructions for use
	Use by YYYY-MM-DD		<i>In vitro</i> diagnostic medical device

14 LITERATURE

1. V. D. Stefano, I. Martinelli, P. M. Mannucci, K. Paciaroni, P. Chiusolo, I. Casorelli, E. Rossi und G. Leone, „The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation,“ *N Engl J Med*, Bd. 341, Nr. 11, pp. 801-806, 1999.
2. A. Gerhardt, R. E. Scharf, M. W. Beckmann, S. Struve, H. G. Bender, M. Pillny, W. Sandmann und R. B. Zotz, „Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium,“ *N Engl J Med*, Bd. 342, Nr. 6, pp. 374-380, 2000.
3. R. F. Franco, M. D. Trip, H. t. Cate, A. v. den, M. H. Prins, J. J. Kastelein und P. H. Reitsma, „The 20210 G-->A mutation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene and the risk for arterial thrombotic disease,“ *Br J Haematol*, Bd. 104, Nr. 1, pp. 50-54, 1999.

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

