## SimPCR ™ Factor V Leiden Genotyping Kit

Cat. No: SBL12-1100/25

### معرفی کیت :

فاکتور V لیدن مهم ترین علت ژنتیکی ترومبوز وریدی است . که اغلب در پاها رخ می دهد، اگرچه می تواند در سایر قسمت های بدن از جمله مغز، چشم ها، کبد و کلیه ها نیز رخ دهد. جهش نقطه ای G>A در نوکلئوتید 1691 در ژن کد کننده این فاکتور انعقادی ، در ۲۰ تا ۶۰ درصد افراد مبتلا دیده می شود . ترومبوفیلی Factor V باعث افزایش خطر جدا شدن لخته های خون از جایگاه اصلی خود و مهاجرت در جریان خون می شود . این لخته ها می توانند در ریه قرار بگیرند که به عنوان آمبولی ریوی شناخته می شود. تعیین ژنوتیپ این ژن می تواند به بهینه سازی داروها و کاهش هزینه های درمانی ناشی از عوارض جانبی نامطلوب و همچنین به شناسایی خطر ژنتیکی هیپرهموسیستئینمی در مراحل اولیه کمک کند.

### اساس کار:

کیت SimPCR ™ Factor V Leiden Genotyping جهت بررسی ژنوتیپ این پلی مورفیسم در ژن Factor V Leiden طراحی شده است . تشخیص جهش بر اساس تقویت ناحیه خاص ژنوم با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوط به آلل های نرمال و جهش یافته Factor V Leiden می باشد. تکثیر این آلل ها با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز مورد بررسی و تایید قرار می گیرد. وجود یک کنترل داخلی برای اطمینان از صحت واکنش PCR و جلوگیری از ایجاد نتایج منفی کاذب ، در طراحی کیت لحاظ شده است .

### محتویات کیت:

| اجزا | عنوان برچسب | مقادیر در کیت |
|---|---|---|
| مسترمیکس | Reaction Mix | ۵۰۰µl |
| الیگومیکس نرمال | Oligomix A | ۷۵ µl |
| الیگومیکس موتانت | Oligomix B | ۷۵ µl |
| کنترل هموزیگوت نرمال | Control A | ۲۰µl |
| کنترل هتروزیگوت | Control B | ۲۰µl |

### پروتکل

### الف) استخراج DNA ژنومی

جداسازی اسید نوکلئیک با کیت استخراج DNA از خون SimBioLab (SBL15-2005) یا سایر کیت های استخراج موجود در بازار طبق پروتکل های استاندارد انجام شود. DNA استخراج شده را می توان برای چندین ماه در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری کرد.

### ب) تهیه مخلوط واکنش PCR

برای بررسی ژنوتایپینگ باید دو مستر واکنش جداگانه (یکی برای آلل نرمال و دیگری برای آلل موتانت) آماده شود. برای هر ران واکنش PCR، یک مخلوط اصلی با حجم مناسب برای ۲ کنترل تعبیه شده در کیت، نمونه های آزمایش (n+1) و یک نمونه کنترل منفی آماده کنید. اجزای واکنش باید مطابق نسبت های داده شده در جدول مخلوط شوند:

| اجزا واکنش | حجم/واکنش |
|---|---|
| مسترمیکس | ۱۰µl |
| الیگومیکس نرمال | ۳µl |

| اجزا واکنش | حجم/واکنش |
|---|---|
| مسترمیکس | ۱۰ µl |
| الیگومیکس موتانت | ۳ µl |

۱۳ میکرولیتر از میکس آماده شده را به هر میکروتیوب اضافه کرده و ۲-۵ میکرولیتر DNA استخراج شده یا DNA کنترل را به آن ها اضافه کنید. سپس آب مقطر استریل را تا حجم ۲۰ میکرولیتر به هر تیوب واکنش اضافه کرده و داخل دستگاه PCR قرار دهید.

### ج) برنامه دمایی واکنش PCR

دستگاه را مطابق پروتکل دمایی زیر تنظیم کنید:

| Step | Temp | Time | Cycle |
|---|---|---|---|
| Initial activation | 95˚C | 5 min | 1 X |
| Denaturation | 95˚C | 30 s | 35-40 X |
| Annealing | 57˚C | 30 s | |
| Extension | 72˚C | 30 s | |
| Final Extension | 72˚C | 5 min | 1 X |

### د) بررسی محصولات PCR با الکتروفورز ژل آگارز

۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR را در کنار یک DNA ladder (۱۰۰ جفت بازی) روی ژل آگارز ۲ درصد ران کنید.

**توجه- به منظور سهولت تفسیر نتایج لوله های مربوطه به واکنش های اختصاصی آلل هر نمونه در کنار هم الکتروفورز شود.**

محصول PCR مربوطه به پرایمرهای Factor V Leiden یک باند تقریباً ۲۳۰ جفت باز را ایجاد می کند و پرایمرهای کنترل داخلی قطعه ای به طول تقریبا ۹۰۰ جفت باز را تقویت می کنند.

نتایج حاصل از الکتروفورز را بر اساس جدول زیر تفسیر کنید:

| | واکنش آلل نرمال | | واکنش آلل موتانت | |
|---|---|---|---|---|
| | باند کنترل داخلی | باند اختصاصی آلل | باند کنترل داخلی | باند اختصاصی آلل |
| هموزیگوت نرمال | +/− | + | + | − |
| هموزیگوت موتانت | + | − | +/− | + |
| هتروزیگوت | +/− | + | +/− | + |
| غیر قابل قبول (تکرار واکنش) | − | − | − | − |
| غیر قابل قبول (تکرار واکنش) | − | − | +/− | + |
| غیر قابل قبول (تکرار واکنش) | +/− | + | − | − |

آدرس:ایران، مشهد، پژوهشکده بوعلی،اتاقهای تمیز مرکز رشدفناوری سلامت

همراه: *+98 915 383 14 07*

تلفن:*+98 372 55 495*

Web address: www.simbiolab.co

E-mail: info@simbiolab.co