



SIMBIOLAB

SimPCR™ Prothrombin Genotyping Kit

Cat. No: SBL12-1309/25

محتویات کیت:

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

برونکل

معرفی کیت:

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) آماده سازی میکس PCR

برای هر واکنش PCR دو میکس جداگانه (یکی برای آلل نرمال و دیگری برای آلل مونات) آماده شود. برای هر ران واکنش PCR، یک ترکیب اصلی با حجم مناسب برای نمونه منفی، نمونه مثبت و نمونه های مورد بررسی (n+1) آماده کنید اجزای واکنش باید مطابق نسبت های داده شده در جدول مخلوط شوند:

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

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

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.

جهش پروترومبین G20210A (فاکتور ۲) نوعی واریانت ژنتیکی است که خطر تشکیل لخته خون در وریدها را تقریباً دو تا سه برابر افزایش می دهد. این واریانت یکی از رایج ترین عوامل خطر ژنتیکی مرتبط با بیماری ترومبوآمبولی وریدی (VTE) است که شامل ترومبوز ورید عمقی و متعاقباً آمبولی ریوی می شود. پروترومبین پیش ساز ترومبین است. پلی مورفیسم در ژن کد کننده فاکتور ۲ باعث افزایش سطح پروترومبین پلاسما (هیپر پروترومبینمی) می شود که احتمالاً به دلیل افزایش ثبات pre-mRNA است.

علامه بالینی ترومبوپیلی ناشی از این واریانت پروترومبین متغیر است. بسیاری از افراد هتروزیگوت یا هموزیگوت 20210 (G20210A) هرگز دچار ترومبوز نمی شوند. اکثر هتروزیگوت هایی که دچار عوارض ترومبوز می شوند تا بزرگسالی بدون علامت می مانند، در حالیکه برخی از آنها ترومبوآمبولی مکرر قبل از ۳۰ سالگی دارند. عوامل مستعد کننده ترومبوز در ترومبوپیلی پروترومبین عبارتند از: تعداد آلل G>A 20210، وجود ناهنجاری های ژنتیکی همزمان از جمله فاکتور ۷ لیدن و اختلالات ترومبوپلیک اکتسابی (مانند آنتی بادی های آنتی فسفولیپید). وجود این پلی مورفیسم ژنتیکی خطر سقط مکرر جنین را افزایش می دهد.

اساس کار:

کیت SimPCR Prothrombin genotyping با بهره گیری از تکنیک ARMS-PCR به منظور تعیین ژنوتیپ ژن پروترومبین در موقعیت 20210 در نمونه های کلینیکی به کار برده می شود؛ تشخیص جهش، براساس تقویت ناحیه خاص ژنوم با استفاده از پرایمر های اختصاصی مربوط به آلل نرمال (G20210) و آلل جهش یافته (A20210) می باشد. این کیت حاوی توالی کنترل داخلی جهت تایید انجام صحیح فرایند تکثیر است. مشاهده نتایج از طریق الکتروفورز ژل آگارز صورت می گیرد.

ج) برنامه واکنش PCR

دستگاه PCR را طبق پروفایل 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 پروتیمین یک باند تقریباً ۳۵۰ جفت باز را ایجاد می کند و پرایمرهای کنترل داخلی قطعه ای به طول تقریباً ۹۰۰ جفت باز را تقویت می کنند.

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

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

آدرس: ایران، مشهد، پژوهشکده بوعلی، اتاقهای تمیز مرکز
رشد فناوری سلامت

همراه: +۹۸ ۹۱۵ ۳۸۳ ۱۴ ۰۷

تلفن: +۹۸ ۳۷۲ ۵۵ ۴۹۵

Web address: www.simbiolab.co

E-mail: info@simbiolab.co