



# Thrombosis kit

Testkit zur Analyse  
von Polymorphismen  
in *F5*-, *F2*- und *MTHFR*-Genen  
(*Gebrauchsanweisung, Seite 3*)

Diagnostic test kit for detection  
of polymorphisms  
in the *F5*, *F2* and *MTHFR* genes  
(*Instruction for use, page 9*)
















71-01



*112 determinations*

**KENNZEICHEN / SYMBOLS LEGEND**

	In-vitro Diagnostikum In vitro diagnostic device		EG-Konformitätserklärung EC Declaration of conformity
	Katalognummer Catalogue number		Lotnummer Batch code
	Verwendbar bis Expiry date		Hersteller Manufacturer
	Bei der angegebenen Temperatur lagern Store at		
	PCR Mix M1 PCR Mix M1		PCR Mix M2 PCR Mix M2
	DNA Polymeraseenzym DNA polymerase enzyme		Puffer für Restriktionsenzym Buffer for restriction enzyme
	Restriktionsenzym Restriction enzyme		Positivkontrolle für M1 und M2 Positive control for M1 and M2

## ANWENDUNGSBEREICH

Der **Thrombosis**-Diagnostikkit ist für die Bestimmung folgender Polymorphismen geeignet: F5-Gen, kodierend für den Gerinnungsfaktor V (+1691G>A Polymorphismus, Faktor-V-Leiden-Mutation), F2-Gen, kodierend für Prothrombin bzw. Gerinnungsfaktor II (+20210G>A Polymorphismus) und MTHFR-Gen, kodierend für die Methylentetrahydrofolat-Reduktase (+677C>T Polymorphismus).

Der am weitesten verbreitete erbliche Risikofaktor für die Thromboseneigung ist die +1691G/A-Mutation im F5-Gen (Faktor-V-Leiden-Mutation, FVL), das für den Gerinnungsfaktor V kodiert. Der Faktor V fungiert als Co-Faktor bei Synthese von Thrombin aus Prothrombin. Dieser Polymorphismus +1691G>A liegt im Bereich des Exon 10 auf dem F5-Gen.

Prothrombin (Gerinnungsfaktor II) ist einer der Hauptkomponenten des Blutgerinnungssystems. Die Mutation +20210G/A des Prothrombin-Gens führt zu einer Erhöhung der Expression dieses Gens. Dadurch steigt die Prothrombin-Konzentration im Blut um das 1,5- bis 2-fache. Dieser Polymorphismus +20210G>A ist im nicht-kodierenden Bereich des 3'-Endes des F2-Gens lokalisiert.

Die Homocystinurie, das heißt die Erhöhung der Homocystein-Konzentration im Blut, ist ein Risikofaktor für die Venen-Thrombose. Der am weitesten verbreitete Polymorphismus, der die Homocystein-Konzentration im Blut beeinflusst, ist der +677C>T Polymorphismus im MTHFR-Gen, das die Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) kodiert. Dieser Polymorphismus befindet sich im Bereich des Exons 4 auf dem MTHFR-Gen.

## ANALYSEPRINZIP

Der **Thrombosis**-Testkit enthält ein Primer-Set für die Amplifikation der spezifischen Gensequenzen für die humanen Gene *F5*, *F2* und *MTHFR*. Die Amplifikate der verschiedenen Genotypen werden durch nachfolgenden Verdau mit spezifischen Restriktionsenzymen hergestellt.

Im Fall der Faktor-V-Leiden-Mutation +1691G>A besitzt die Hauptvariante (G, geschützt) eine Schnittstelle für die Endonuklease während die seltene Variante (A, pathogen) diese nicht hat.

Im Fall des +20210G>A-polymorphism besitzt die Hauptvariante (G, geschützt) eine Schnittstelle für die Endonuklease während die seltene Variante (A, pathogen) diese nicht hat.

Im Fall des +677C>T-polymorphism besitzt die seltene Variante (T, pathogen) eine Schnittstelle für die Endonuklease während die Hauptvariante (C, geschützt) diese nicht hat.

Die Produkte des enzymatischen Abbaus werden mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt und detektiert.

## PATIENTENPROBEN

Für die Durchführung der Analyse wird empfohlen, Patientenproben mit einer DNA-Konzentration von 10÷500 ng/µl einzusetzen. Genomische DNA kann aus Blut, Gewebeproben oder Epithel extrahiert werden.

## KIT - INHALT

<b>M1</b>	<b>PCR Mix M1 (+1691G&gt;A F5)</b>	1,5ml-Gefäß, grüner Deckel	585 µl, gebrauchsfertig
<b>M2</b>	<b>PCR Mix M2 (+20210G&gt;A F2 und +677C&gt;T MTHFR)</b>	1,5ml-Gefäß, orangefarbener Deckel	585 µl, gebrauchsfertig
<b>P</b>	<b>DNA Polymeraseenzym (Purpur)</b>	0,5ml-Gefäß, gelber Deckel	45 µl, gebrauchsfertig
<b>C</b>	<b>Positivkontrolle für M1 und M2</b>	0,5ml-Gefäß, brauner Deckel	19 µl, gebrauchsfertig
<b>E</b>	<b>Restriktionsenzym</b>	0,5ml-Gefäß, violetter Deckel	39 µl, gebrauchsfertig
<b>B</b>	<b>Puffer für Restriktionsenzym</b>	0,5ml-Gefäß, violetter Deckel	210 µl, gebrauchsfertig
	Halter für Reagenzgefäße	1	

**ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN:**Reagenzien:

- Mineralöl (für einen PCR-Cycler ohne beheizbaren Deckel);
- Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml);
- Reagenzien für eine Elektrophorese in Polyacrylamid- oder Agarosegelen.

Instrumente:

- PCR-Box;
- Thermocycler;
- Zentrifuge;
- Vortex;
- Sterile Einkanalpipetten mit variabler Volumeneinstellung (0,5 - 1000 µl);
- Sterile zum Thermocycler passende Reaktionsgefäße;
- Thermoblock
- Apparatur für die Gelelektrophorese.

**GRÖÖE UND LAGERUNG**

Der Kit ist für das Durchführen von 112 PCR's gestaltet. Das entspricht der Analyse von 40 Proben. In 112 Testuntersuchungen sind Mischungen für 80 Patientenproben (40 für M1 und 40 für M2), 16 Positiv- und 16 Negativkontrolle eingeschlossen.

Der Testkit muss bei -18...22°C gelagert werden. Die einzelnen Reagenzien sind in geschlossenen Gefäßen innerhalb der Haltbarkeitsdauer stabil.

**TESTDURCHFÜHRUNG**Empfehlungen des Herstellers:

Wir empfehlen vor der Analyse ein Protokoll von PCR und Stufen der enzymatischen Restriktion anzufertigen.

Wir empfehlen den Testkit für 7 Untersuchungen in jedem PCR-Mix zu verwenden: Mix1 (Analyse von +1691G/A-Polymorphismus im *F5*-Gen) und Mix2 (Analyse von +20210G/A-Polymorphismus im *F2*-Gen und von +677C/T-Polymorphismus im *MTHFR*-Gen).

Komposition der einzelnen empfohlenen Serien der Experimente: 5 Testproben + 1 Positivkontrolle von PCR- und Enzymhydrolyseablauf + 1 Negativkontrolle. In jeder Serie muss eine Doppelbestimmung durchgeführt werden: 2x5 Testproben + 2x1 Reaktion mit einer Positivkontrolle + 2x1 Reaktion mit einer Negativkontrolle entsprechend den 2 PCR-Mixen. Insgesamt: 14 Untersuchungen in einer Serie der Experimente.

Das ganze Verfahren besteht aus 3 Schritten:

1. Amplifikation mit für *COL1A1*- and *VDR*-Genen spezifischen Primern;
2. Enzymatische Restriktion der PCR-Produkte;
3. Detektion der Restriktionsfragmente mittels Gelelektrophorese.

**1. Amplifikation****1.1. PCR-Durchführung**

- Die Lösungen M1, M2 und C müssen vollständig aufgetaut werden, während der Rest des Kits im Tiefkühlschrank aufbewahrt werden muss. Alle Komponente müssen vor der Benutzung für 10 Sekunden gut gevortext werden.
- Nehmen Sie eine doppelte Anzahl von Reaktionsgefäßen für jede Patientenprobe,
  - + 2 für die DNA-Positivkontrollen (C1 und C2),
  - + 2 für die Negativkontrollen von PCR (entionisiertes Wasser (O1 und O2); wird nicht mitgeliefert).
 und stellen Sie sie auf den Halter.
- Nehmen Sie P Reaktionsgefäß und platzieren ihn auf dem Halter. Räumen Sie den Kit in den Tiefkühlschrank weg.
- M1, M2, C und P sind zur Anwendung bereit.

- Bereiten Sie Mastermixe entsprechend der Tabelle vor (N ist die Nummer der Untersuchungen in jedem Mix):

PCR-Reagenzien	Menge des Mastermixes (M1)	Menge des Mastermixes (M2)
PCR Mix (M1 oder M2)	8.7 $\mu\text{l}$ x (N+1)	8.7 $\mu\text{l}$ x (N+1)
Polymerase P	0.3 $\mu\text{l}$ x (N+1)	0.3 $\mu\text{l}$ x (N+1)
<b>Gesamtvolumen:</b>	<b>9.0 <math>\mu\text{l}</math> x (N+1)</b>	<b>9.0 <math>\mu\text{l}</math> x (N+1)</b>

- Die Reaktionsgefäße mit Mastermixen gut vortexen und für 10 Sekunden abzentrifugieren.
- Die Mastermixe (9  $\mu\text{l}$  für M1 und M2) in die vorbereiteten sterilen für den Thermocycler passenden PCR-Gefäße pipettieren sowie je 1  $\mu\text{l}$  DNA (oder Kontrollproben: DNA aus C-Reaktionsgefäß in die C1- und C2-Reaktionsgefäße und entionisiertes Wasser in die O1- und O2-Reaktionsgefäße), und abzentrifugieren.
- Für die PCR in einem PCR-Cycler ohne beheizbaren Deckel je 30  $\mu\text{l}$  von Mineralöl zu den Reaktionsansätzen pipettieren.
- Die Reaktionsgefäße in den Thermocycler stellen.
- PCR nach dem folgenden Programm durchführen:

PCR		
Stufe	Temperatur	Zeit
Denaturierung:	96 <sup>o</sup> C	2 min
30 Zyklen:	96 <sup>o</sup> C	10 s
	62 <sup>o</sup> C	15 s
	72 <sup>o</sup> C	20 s
Synthese:	72 <sup>o</sup> C	10 s

## 2. Enzymatische Restriktion der PCR-Produkte

2.1. Gefäß mit der Beschriftung „B“ auf den Halter stellen und bei Raumtemperatur vollständig auftauen lassen, danach gut vortexen und für 10 Sekunden abzentrifugieren.

2.2. Das „E“-Gefäß rausnehmen und auf Eis aufbewahren.

2.3. B, und E sind zum Anwenden bereit.

2.4. Mastermixe entsprechend der Tabelle vorbereiten (N ist die Nummer der Reaktionen in jedem Mix):

Reagenzien	Menge des Mastermixes
Puffer (B)	1.7 $\mu\text{l}$ x (2N+2)
Enzym (E)	0.3 $\mu\text{l}$ x (2N+2)
<b>Gesamtvolumen:</b>	<b>2 <math>\mu\text{l}</math> x (2N+2)</b>

2.5. Die Reaktionsgefäße mit Mastermixen gut vortexen und für 10 Sekunden abzentrifugieren.

2.6. 2  $\mu\text{l}$  von Mastermix zu allen PCR-Proben hinzufügen.

2.7. Die Reaktionsgefäße mit Mastermixen gut vortexen und für 10 Sekunden abzentrifugieren..

2.8. Die Reaktionsgefäße 2 Stunden oder über Nacht in einem Thermoblock bei +650<sup>o</sup>C inkubieren.

## 3. Detektion der Restriktionsfragmente und Interpretation der Ergebnisse

### 3.1. Gelelektrophorese

Elektrophorese kann entweder in Polyacrylamid- oder Agarosegelen durchgeführt werden:

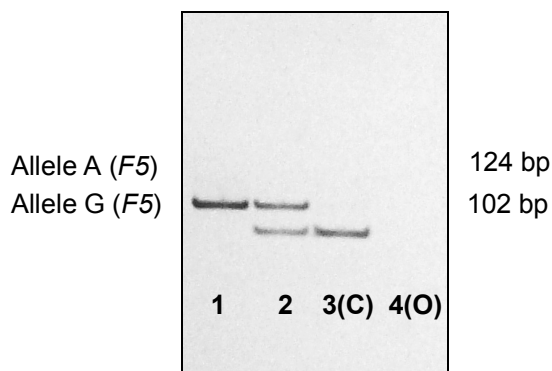
- Bei Polyacrylamidgelen: 8%-Gel ist empfohlen. 5  $\mu\text{l}$  von jeder Probe auftragen. Das Gel bei einer Spannung, die sich aus 15 V pro cm Gel berechnet, laufen lassen. Die Farbbande sollte 7 cm vom Startpunkt aus gelaufen sein. Danach muss das Gel mit einer Ethidiumbromidlösung (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) gefärbt werden.

- Bei Agarosegelen: 2,5-3%-Gel ist empfohlen. 5  $\mu\text{l}$  von jeder Probe auftragen. Das Gel und der Laufpuffer müssen Ethidiumbromid enthalten (0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Das Gel bei einer Spannung, die sich aus 15 V pro cm Gel berechnet, laufen lassen. Die Farbbande sollte 3-4 cm vom Startpunkt aus gelaufen sein.

**Merke:** Es ist nicht notwendig, die Proben vor der Elektrophorese mit einem Farbstoff zu markieren.

### 3.2. Auswertung der Restriktionsergebnisse

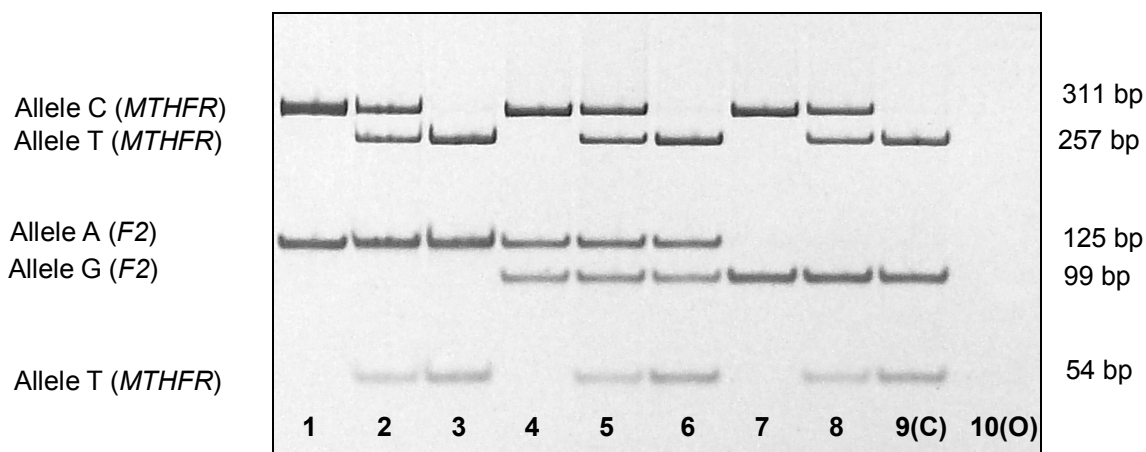
Es sind entsprechende Banden in den Gelspuren, die den Banden der Positivkontrolle entsprechen (C) (Abbildung 1 und 2).



**Abbildung 1.** Beispiel für Ergebnisse einer enzymatischen Restriktion von M1-Mix (Polymorphismus +1691G/A im *F5*-Gen) (Alle Genotyp-Variationen sind auf dem Bild vorhanden).

Erläuterung zur Abbildung 1:

Gelspur	Genotyp: <i>F5</i> +1691G/A	Fragmentlänge (bp)
1	pathogen:A / pathogen:A	124
2	geschützt:G / pathogen:A	124 / 102
3(C)	geschützt:G / geschützt:G	/ 102
4(O)	-	-



**Abbildung 2.** Beispiel für Ergebnisse einer enzymatischen Restriktion von M2-Mix (Polymorphismus +20210G/A im *F2*-Gen und +677C/T im *MTHFR*-Gen) (Alle Genotyp-Variationen sind auf dem Bild vorhanden).

Erläuterung zur Abbildung 2:

Gelspur	Genotyp: <i>F2</i> +20210G/A	Genotyp: <i>MTHFR</i> +677C/T	Fragmentlänge (bp)
1	pathogen:A / pathogen:A	geschützt:C / geschützt:C	311 / 125
2	pathogen:A / pathogen:A	geschützt:C / pathogen:T	311 / 257 / 125 / 54
3	pathogen:A / pathogen:A	pathogen:T / pathogen:T	/ 257 / 125 / 54
4	geschützt:G / pathogen:A	geschützt:C / geschützt:C	311 / 125 / 99
5	geschützt:G / pathogen:A	geschützt:C / pathogen:T	311 / 257 / 125 / 99 / 54
6	geschützt:G / pathogen:A	pathogen:T / pathogen:T	/ 257 / 125 / 99 / 54
7	geschützt:G / geschützt:G	geschützt:C / geschützt:C	311 / 99
8	geschützt:G / geschützt:G	geschützt:C / pathogen:T	311 / 257 / 99 / 54
9(C)	geschützt:G / geschützt:G	pathogen:T / pathogen:T	/ 257 / 99 / 54
10(O)	-	-	-

## TESTCHARAKTERISTIKA

### Spezifität:

- Spezifität des Testkits wird durch Auswahl der Primern erreicht, die den zu untersuchenden Bereich des DNA-Moleküls flankieren. Die Positivkontrolle ist dafür bestimmt, die Qualität und Funktionalität aller PCR- und Restriktionskomponente nachzuweisen. Die Positivkontrolle weist nach einer elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Amplifikate im ultravioletten Licht (UV) Banden auf, die eine charakteristische Größe haben (Abbildung 1 und 2).
- Die Negativkontrolle weist auf Abwesenheit einer DNA-Kontamination. Entsprechende Gelbanden müssen keine PCR-Produkte enthalten (Abbildung 1 und 2).

### Empfindlichkeit:


Die analytische Sensitivität des Thrombosis-Testkits, das heißt die bestimmbare Konzentration der gesamten genomischen DNA in einer Probe beträgt 10 ng/µl.

## GRENZEN DER METHODE

Eine klinische Diagnose sollte nicht allein mit Hilfe der Ergebnisse einer IVD-Methode erhoben werden. Zur Diagnosestellung sollten vom Arzt alle verfügbaren klinischen und Laborbefunde berücksichtigt werden.

Die entstehenden Restriktionsprodukte müssen zu den angegebenen Größen passen und mit der Positiv-Kontrolle übereinstimmen. Sollte das nicht der Fall sein, muss die Probe erneut getestet werden oder die vollständige Analyse muss mit frisch isolierter DNA wiederholt werden. Wenn keine Restriktionsprodukte aus der Positiv-Kontrolle vorhanden sind, war die Amplifikation fehlerhaft.

## VORSICHTSMAßNAHMEN

- **Der Testkit ist ausschließlich zum in vitro-Gebrauch bestimmt.** Um die zuverlässigen Testergebnisse zu erhalten, ist der Arbeitsanleitung strikt einzuhalten. Diese Gebrauchsanweisung ist nur für gegebenen Kit mit gelisteten Komponenten gültig. Ein Austausch von Kitkomponenten ist nach der CE-Regulierung nicht erlaubt.
- Alle Reagenzien dieses Testkits, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg (Hepatitis B surface Antigen) bzw. Antikörper gegen HIV (Human Immunodeficiency Virus) und HCV (Hepatitis C Virus) ein negatives Ergebnis. Dennoch kann das Vorhandensein infektiöser Erreger durch keinen Test mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden. 
- Der Testkit muss nur vom ausgebildeten Personal nach Anhaltung der Anforderungen der guten Laborpraxis (GLP) verwendet werden.
- Der Testkit oder einzelne Kit-Komponenten dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Die PCR-Technologie ist sehr sensitiv. Die Amplifikation eines einzelnen DNA-Moleküls generiert Millionen identischer Kopien. Deshalb sollten drei von einander getrennte Arbeitsbereiche eingerichtet werden, für: a) die Probenvorbereitung, b) die Vorbereitung der PCR-Reagenzien und c) für die Restriktion und DNA-Bestimmung. Für jeden dieser Arbeitsbereiche sollten eigene Pipettensätze verwendet werden.
- Tragen Sie in jedem dieser Arbeitsbereiche unterschiedliche Laborkittel und Handschuhe.
- Benutzen Sie sterile Filter-Pipettenspitzen und speziell für die PCR geeignete Pipetten zum aerosolfreien pipettieren.
- Reinigen und dekontaminieren Sie regelmäßig Ihre Pipetten und Arbeitsplätze.
- Vermeiden Sie die Erzeugung von Aerosolen.

### INTENDED USE

The **Thrombosis** diagnostic kit is intended for detection of polymorphisms in *F5* gene encoding coagulation factor V (+1691G>A polymorphism – Leiden mutation), in *F2* gene encoding prothrombin or coagulation factor II (+20210G>A polymorphism), and in the *MTHFR* gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase enzyme (+677C>T polymorphism).

The most general factor of hereditary thrombophilia is +1691G/A mutation in *F5* gene (Leiden mutation) encoding coagulation factor V which is the cofactor at formation thrombin from prothrombin.

Polymorphism +1691G>A is located in exon 10 of the *F5* gene.

Prothrombin (coagulation factor II) is one of the main components of blood coagulation system. Mutation +20210G/A of the prothrombin gene increases the expression of this gene that leads to increase of the prothrombin concentration in blood in 1.5-2 times.

Polymorphism +20210G>A is located in 3'-untranslated region of the *F2* gene.

Hyperhomocysteinemia i.e. increase of the homocysteine concentration in blood is one of the risk factors of venous thrombosis. The most widespread polymorphism influencing the homocysteine level in blood is the +677C>T polymorphism in the *MTHFR* gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase enzyme.

Polymorphism +677C>T is located in exon 4 of the *MTHFR* gene.

### PRINCIPLE OF THE TEST

The **Thrombosis** kit contains a set of primers for amplification of the specific sequence within the human genes *F5*, *F2* and *MTHFR*. Amplicons of the varying genotypes are determined by a subsequent specific restriction enzyme digestion.

In the case of +1691G>A (Leiden mutation): The major variant (G, protective) possesses a restriction site for the endonuclease whereas rare variant (A, pathogen) does not.

In the case of +20210G>A polymorphism: The major variant (G, protective) possesses a restriction site for the endonuclease whereas rare variant (A, pathogen) does not.

In the case of +677C>T polymorphism: The rare variant (T, pathogen) possesses a restriction site for the endonuclease whereas the major variant (C, protective) does not.

The products of enzymatic digestion are further detected by a gel electrophoresis.

### PATIENT'S SAMPLES

It is recommended to use patient's total DNA samples with a concentration range 10÷500 ng/μl. Genomic DNA can be extracted from blood, tissue samples or epithelium.

### Material Provided

<b>M1</b>	<b>PCR Mix M1 (+1691G&gt;A <i>F5</i>)</b>	Micro test-tube with green cover – 1.5ml	585 μl, ready to use
<b>M2</b>	<b>PCR Mix M2 (+20210G&gt;A <i>F2</i> and +677C&gt;T <i>MTHFR</i>)</b>	Micro test-tube with orange cover – 1.5ml	585 μl, ready to use
<b>P</b>	<b>DNA Polymerase enzyme (purple)</b>	Micro test-tube with yellow cover – 0.5ml	45 μl, ready to use
<b>C</b>	<b>Positive control for M1 and M2</b>	Micro test-tube with brown cover – 0.5ml	19 μl, ready to use
<b>E</b>	<b>Restriction enzyme</b>	Micro test-tube with purple cover – 0.5ml	39 μl, ready to use
<b>B</b>	<b>Buffer for restriction enzyme</b>	Micro test-tube with purple cover – 0.5ml	210 μl, ready to use
	Holder for test-tubes	1	

## MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED WITH THE KIT:

### Reagents:

- mineral oil (optional, for thermal cycler without heated lid);
- ethidium bromide (10 mg/ml);
- reagents for electrophoresis in agarose or acrylamide gels.

### Instruments:

- PCR-box;
- thermal cycler;
- centrifuge;
- vortex;
- pipettes (0.5 - 1000 µl) and sterile pipette tips;
- sterile micro tubes suitable for the thermal cycler in use;
- thermoblock;
- instruments for gel electrophoresis.

## SIZE AND STORAGE

The kit is designed for 112 test reactions that will be sufficient for testing of 40 clinical samples. 112 test reactions include: 80 mixes for patient samples (40 for M1 and 40 for M2), 16 for positive and 16 for negative controls.

The kit should be stored at -18...-22°C. The reagents are stable in the unopened micro tubes until the expiration date indicated on the package.

## ASSAY PROCEDURE

### Manufacturer's recommendations:

We recommend setting up blank protocols of PCR and enzyme digestion stages before the analysis.

We recommend using the diagnostic kit for 7 reactions in each PCR mix: Mix1 (analysis of +1691G/A polymorphism in the *F5* gene) and Mix2 (analysis of +20210G/A polymorphism in *F2* and +677C/T polymorphism in *MTHFR*).

Composition of single recommended series of experiments: 5 test samples + 1 positive control of PCR and enzyme digestion + 1 negative control. Each series is to be duplicated: 2x5 test samples + 2x1 reactions with positive controls + 2x1 reactions with negative controls according to two PCR mixes. In total: 14 reactions in one series of experiments.

The complete procedure consists of three steps:

1. Amplification;
2. Digestion of the PCR products with restriction enzyme;
3. Detection of the digested DNA by gel electrophoresis.

### 1. Amplification

#### 1.1. PCR carrying

- Defrost the M1, M2, C micro tubes, while keeping the rest of the kit in freezer. Stir and centrifuge for 10 seconds all the components before use.
- Take micro tubes twice as much as a number of samples to be analysed,
  - + 2 for control DNA samples (C1 and C2),
  - + 2 for negative controls of PCR (deionized water (O1 and O2); is not provided).
 and place them in a holder.
- Take P micro tube and place it in a holder. Put the kit in refrigerator.
- M1, M2, C and P are ready to use.
- Prepare Master Mixes according to the table below (where N is a number of reactions in each mix):

<i>PCR reagents</i>	<i>Master Mix (M1) volume</i>	<i>Master Mix (M2) volume</i>
PCR Mix (M1 or M2)	8.7 µl x (N+1)	8.7 µl x (N+1)
Polymerase P	0.3 µl x (N+1)	0.3 µl x (N+1)
<b>Total volume:</b>	<b>9.0 µl x (N+1)</b>	<b>9.0 µl x (N+1)</b>

- Stir micro tubes with Master Mixes and centrifuge for 10 seconds.
- Aliquot Master Mixes (**9 µl** for M1 and M2) into sterile micro tubes suitable for the thermal cycler, add **1 µl** of the **extracted DNA** (or control samples: DNA from C micro tubes into C1 and C2 micro tubes, and deionized water into O1 and O2 micro tubes) and centrifuge.
- If using thermal cycler without a heated lid overlay the mixes with 30 µl of mineral oil.
- Put the micro tubes into the thermal cycler.
- Perform the following amplification protocol:

PCR		
Stage	Temperature	Time
Initial Hold:	96 <sup>0</sup> C	2 min
30 cycles:	96 <sup>0</sup> C	10 s
	62 <sup>0</sup> C	15 s
	72 <sup>0</sup> C	20 s
Final Hold:	72 <sup>0</sup> C	10 s

## 2. Digestion of the Amplified DNA

**2.1.** Take B micro tube and place it in a holder. Keep the component at room temperature until final defrosting. Mix the component and centrifuge for 10 seconds before use.

**2.2.** Take E micro tube and place it on ice.

**2.3.** B and E are ready to use.

**2.4.** Prepare Master Mix according to the table below (where N is a number of reactions in each mix):

Digestion reagents	Master Mix volume
Buffer (B)	1.7µl x (2N+2)
Enzyme (E)	0.3 µl x (2N+2)
<b>Total volume:</b>	<b>2 µl x (2N+2)</b>

**2.5.** Stir Master Mix and centrifuge for 10 seconds.

**2.6.** Add **2 µl** of Master Mix into all PCR samples.

**2.7.** Stir Master Mixes and centrifuge for 10 seconds.

**2.8.** Put the micro tubes into a thermoblock and incubate for 2 hours (or night) at 65<sup>0</sup>C.

## 3. Detection of the Digested DNA and Interpretation of the Results

### 3.1. Gel electrophoresis

Electrophoresis can be run either in acrylamide or agarose gel:

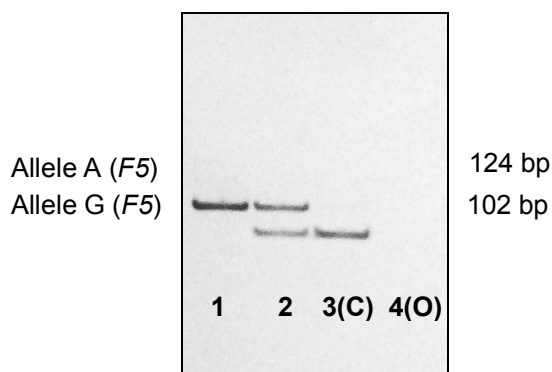
- In case of using acrylamide, 8% gel is recommended. Load **5 µl** of each sample. Run the gel at voltage 15 V/cm. The dye band should pass 7 cm from the start. Stain the gel in the ethidium bromide solution (1 µg/ml).

- In case of using agarose, 2-3% gel is recommended. Load **5 µl** of each sample. The gel and the running buffer should contain ethidium bromide (0,1 µg/ml). Run the gel at voltage 15 V/cm. The dye band should pass 3-4 cm from the start.

**Note.** It's not necessary to add loading dye to the samples before electrophoresis.

### 3.2. Registration of the Digestion results

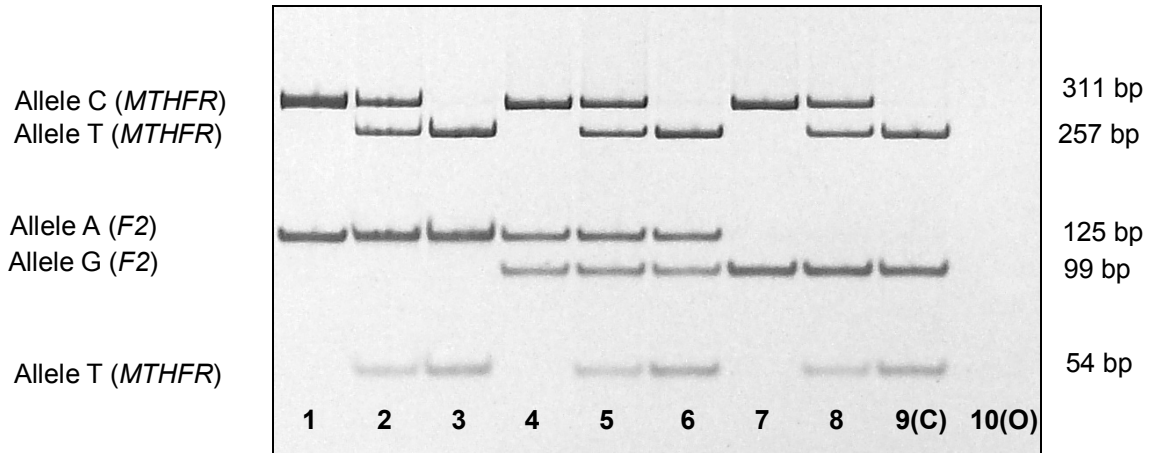
There are appropriate bands in the gel lanes with positive digestion control (C) (Pic.1 and 2).



**Picture 1.** Example of the digestion results for M1 Mix (polymorphism +1691G/A in F5) (All genotype variants are present on the picture).

Explanation of the Picture 1:

Lane	Genotype: <i>F5</i> +1691G/A	Fragment length (bp)
1	pathogen:A / pathogen:A	124
2	protective:G / pathogen:A	124 / 102
3(C)	protective:G / protective:G	/ 102
4(O)	-	-



**Picture 2.** Example of the digestion results for M2 Mix (polymorphism +20210G/A in *F2* and +677C/T in *MTHFR*) (All genotype variants are present on the picture).

Explanation of the Picture 2:

Lane	Genotype: <i>F2</i> +20210G/A	Genotype: <i>MTHFR</i> +677C/T	Fragment length (bp)
1	pathogen:A / pathogen:A	protective:C / protective:C	311 / 125
2	pathogen:A / pathogen:A	protective:C / pathogen:T	311 / 257 / 125 / 54
3	pathogen:A / pathogen:A	pathogen:T / pathogen:T	/ 257 / 125 / 54
4	protective:G / pathogen:A	protective:C / protective:C	311 / 125 / 99
5	protective:G / pathogen:A	protective:C / pathogen:T	311 / 257 / 125 / 99 / 54
6	protective:G / pathogen:A	pathogen:T / pathogen:T	/ 257 / 125 / 99 / 54
7	protective:G / protective:G	protective:C / protective:C	311 / 99
8	protective:G / protective:G	protective:C / pathogen:T	311 / 257 / 99 / 54
9(C)	protective:G / protective:G	pathogen:T / pathogen:T	/ 257 / 99 / 54
10(O)	-	-	-

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY

### Specificity:

- Specificity of the kit is achieved by the selection of specific primers flanking the analyzed region of DNA molecule. Positive control is designed to validate quality and functionality of all the PCR and restriction components. The respective digested PCR products of positive control must appear on the gel as bands of the expected size (Pic.1 and 2).
- Negative control is supposed to represent absence of a DNA contamination. The respective gel lanes must not contain any PCR products (Pic.1 and 2).

### Sensitivity:


Sensitivity of the Thrombosis kit, i.e. lowest detectable concentration of total genomic DNA in a sample that can be analyzed, is 10 ng/μl.

### **LIMITATION OF THE METHOD**

Any clinical diagnosis should not be based on the results of in vitro diagnostic methods alone. To state a diagnosis, the physician is supposed to consider all the available clinical and laboratory findings.

All the resulting digestion products must correspond to the indicated sizes and match the positive controls. If this is not the case, the sample must be tested one more time or the complete analysis must be repeated with freshly isolated DNA. If the positive control digestion products are not present, the analysis is to be considered incorrect.

### SAFETY PRECAUTIONS

- **This kit is for in vitro diagnostic use only.** The operator should thoroughly follow the manual to obtain the reliable data. This instruction manual is valid only for the present kit with the listed contents. Any exchange of the kit components is not allowed by CE regulations.
- Source materials of human origin that were used in preparation of this kit were tested and found negative for HBsAg, anti-HIV and anti-HCV antibodies. However, no known laboratory test guarantees the absence of these viral agents. Therefore, the kit components and patient's samples should be handled as potentially hazardous. 
- Test should only be performed by skilled persons considering GLP (Good Laboratory Practice) guidelines.
- Don't use the kit after its expiration date.
- PCR technology is extremely sensitive. The amplification of a single DNA molecule generates millions of identical copies. Therefore, set up three separate working areas for a) sample preparation, b) PCR reagent preparation and c) restriction and DNA detection. For each working area a different set of pipettes should be reserved.
- Wear separate coats and gloves in each working area.
- Use sterile filter tips for pipetting and use special PCR pipettes for aerosol free pipetting.
- Routinely decontaminate your pipettes and the laboratory benches.
- Avoid aerosols.

April, 13, 2011



Astra Biotech GmbH  
Im Biotechnologiepark, TGZ I  
14943 Luckenwalde, Germany  
Telefon: +49 (0) 3371 / 681-450  
E-Mail: [info@astrabiotech.de](mailto:info@astrabiotech.de)  
[www.astrabiotech.de](http://www.astrabiotech.de)