راهنمای کیت هموکروماتوزیس

Hemochromatosis RQ Kit

پاییز ۱۴۰۴، ویراش ۱/۱

جهت تشخیص جهش های H63D و C282Y به روش Real-Time PCR

مخصوص تحقیقات

24 (Cat# HMCHRQ24)

48 (Cat# HMCHRQ48)

96 (Cat# HMCHRQ96)

NG-WI-ASL-50-101

RUO

شرکت نوین ژن پارس ویرا

تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶

Novin Gene

فهرست مندرجات:

۱. مقدمه..... ۳
۲. حیطه کاربرد..... ۳
۳. اطلاعات زمینه ای..... ۳
۴. اساس آزمایش..... ۳
۵. محتویات کیت..... ۴
۶. مدل های بسته بندی..... ۴
۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت..... ۴
۸. محدودیت کاربرد..... ۵
۹. سایر موارد مورد نیاز..... ۵
۱۰. احتیاط و نکات لازم..... ۶
۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن..... ۷
۱۲. عوامل مزاحم..... ۷
۱۳. کنترل داخلی..... ۷
۱۴. استخراج DNA..... ۸
۱۵. دستورکار PCR و مراحل آزمایش..... ۸
۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها..... ۹
۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene..... ۹
۱۸. تنظیم دستگاه StepOne..... ۱۱
۱۹. تنظیم سایر دستگاه ها..... ۱۲
۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene..... ۱۲

۲۱. آنالیز نتایج StepOne ۱۷
۲۲. روش امحاء ۲۲
۲۳. پشتیبانی فنی ۲۳
۲۴. اطلاعات تماس ۲۳
۲۵. منابع ۲۳
۲۶. توضیحات برچسب ۲۴

۱. مقدمه

کیت Hemochromatosis RQ جهت تشخیص جهش مربوط به H63D و C282Y در DNA انسانی به روش Real-Time PCR طراحی شده است. در این روش، توالی مورد نظر در نمونه DNA بیمار به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می‌شود. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی کاربرد دارد.

۲. حیطه کاربرد

کیت Hemochromatosis RQ امکان تشخیص جهش مربوط به H63D و C282Y در DNA انسانی را با روش Real-Time PCR فراهم می‌کند. این کیت جهت استفاده با دستگاه Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

بیماری هموکروماتوزیس ارثی (Hereditary Hemochromatosis) به دلیل جذب بیش از حد آهن و تجمع آن در بافت‌ها اتفاق می‌افتد. برخی جهش‌ها در ژن HFE از جمله H63D، C282Y و S65C منجر به این بیماری می‌شوند. عوارض بیماری و علایم بالینی می‌تواند متفاوت باشد و بافت‌ها و اندام‌های مختلفی از جمله کبد، قلب، غدد درون ریز، مفاصل و پوست را درگیر نماید.

۴. اساس آزمایش

در این کیت، شناسایی توالی ژنتیکی با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز Polymerase Chain Reaction/PCR انجام می‌شود. طی این واکنش ماده ژنتیکی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناسایی و تکثیر می‌شود. در روش Real-Time PCR توالی تکثیر شده با استفاده از پروب‌های فلورسنت

قابل تشخیص می‌گردد. بنابراین، با بررسی میزان فلورسنت در طی واکنش می‌توان وجود توالی مورد نظر یا جهش را در نمونه تشخیص داد، بدون آنکه پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به اینکه در این روش نیازی به بررسی محصول واکنش با روش‌هایی مشابه الکتروفورز وجود ندارد، امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

۵. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک فلش کارت و مواد زیر می باشد:

برچسب	محتوا	حجم
282/63 M Mix	میکس آماده برای جهش‌های ۲۸۲ و ۶۳ *	۴۸۰ میکرولیتر
282/63 W Mix	میکس آماده برای Wild Type *	۴۸۰ میکرولیتر
282/63 MM Ctrl	کنترل مثبت هموزیگوت	۵۰ میکرولیتر
282/63 WM Ctrl	کنترل مثبت هتروزیگوت	۵۰ میکرولیتر
282/63 WW Ctrl	کنترل منفی (هموزیگوت سالم)	۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

* یک، دو یا چهار تیوب، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۶. مدل های بسته بندی

کیت در قالب های بیست وچهار، چهل و هشت، و نود و شش واکنش بیست و پنج میکرولیتری در دسترس می باشد.

۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰- درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند.

از ذوب و انجماد مکرر محتویات کیت بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود.
همچنین برای حمل و نقل کیت از یخ خشک استفاده نمایید.

۸. محدودیت کاربرد

- این کیت تنها برای استفاده توسط کاربران حرفه ای و آموزش دیده طراحی شده است.
- تمامی مراحل کار بایستی مطابق دفترچه راهنمای کامل کیت انجام شود و هرگونه تغییری در آن منجر به بروز خطا در نتایج می‌گردد.
- از محتویات کیت نباید پس از گذشت تاریخ انقضای درج شده روی کیت استفاده شود.
- در صورت تغییر رنگ لیبل حرارتی (به صورتی یا قرمز) حتی به صورت جزئی کیت نباید مورد استفاده قرار گیرد.
- این کیت تنها برای مصارف تحقیقاتی طراحی شده و برای تشخیص طبی (IVD) مورد تایید نمی‌باشد.

۹. سایر موارد مورد نیاز

برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:

- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
- سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب
- ورتکس (Vortex Mixer)
- بلوک حرارتی رومیزی (Dry Block Heater)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA

- تیوب ۱/۵ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

۱۰. احتیاط و نکات لازم

برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:

- هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج ، فضای آماده سازی مواد (برای افزودن میکس به لوله های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به لوله PCR) می باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود، به ویژه سمپلر، را داشته باشند. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.
- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.
- هنگام استفاده، مواد کیت را روی یخ خرد شده نگه دارید تا کاملاً ذوب شده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخ‌های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- در حین کار، میکروتیوب های PCR را روی بلوک سرد گذاشته، و از گذاشتن آنها بر روی یخ خرد شده خودداری کنید.

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش با این کیت، ۰/۵ میلی لیتر خون کامل (Peripheral blood) می‌باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می تواند EDTA یا سیترات باشد. خون کامل را می‌توان تا ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود. برای نگهداری نمونه در زمان های طولانی تر، آن را به حجم های کوچک تقسیم نموده و سپس در دمای ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری نمود. در چنین شرایطی نمونه تا چند ماه پایدار می ماند.

برای رسیدن به نتیجه مطلوب نمونه باید حاوی ۱۵ نانوگرم DNA در میکرولیتر باشد. گرچه با مقادیر کمتر یا بیشتر در بازه ۱ الی۵۰ نانوگرم DNA در میکرولیتر نیز تست به نتیجه خواهد رسید.

۱۲. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می‌شود. به همین دلیل لوله حاوی هپارین به عنوان ضد انعقاد مناسب نیست و نباید استفاده شود. همچنین نمونه بیماران تحت درمان با هپارین نیز برای PCR مناسب نمی‌باشد.

مقادیر بالای بیلی‌روبین (تا حداکثر ۴/۵ میلی گرم در دسی لیتر) و چربی (تا حداکثر ۱۰۰۰میلی گرم در دسی لیتر) و نیز همولیز خون برای این آزمایش مزاحمتی ایجاد نمی‌کند.

۱۳. کنترل داخلی

با توجه به اینکه دو ژن H63D و C282Y در این کیت بررسی می‌شود و هر فرد حامل ژن های طبیعی یا جهش یافته و یا هر دوی آنها می‌باشد، بنابراین همیشه

باید نتیجه این آزمایش دست کم برای یکی از انواع طبیعی یا جهش یافته ژن مثبت باشد. در نتیجه این آلل ها خود به عنوان کنترل داخلی این آزمایش عمل می‌کنند. در صورتی که فردی برای هر دو آلل طبیعی و جهش یافته منفی باشد، واکنش ناموفق بوده و آزمایش باید تکرار شود.

۱۴. استخراج DNA

برای استخراج از روش‌ها و کیت های مختلفی می‌توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت های زیر را توصیه می‌کنیم:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat# 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

برای رسیدن به حساسیت لازم نمونه مناسب باید حاوی ۱ الی ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر DNA باشد.

۱۵. دستور کار PCR و مراحل آزمایش

ابتدا تمامی لوله ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا بطور کامل محتویات آنها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن آنها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفیوژ کنید.

این کیت حاوی دو میکس می باشد. میکس **282/63 M** برای تشخیص آلل های جهش یافته و میکس **282/63 W** برای تشخیص آلل های سالم. هر نمونه باید با هر دو میکس برای دو آلل جهش یافته و سالم بررسی شود. به این منظور دو آزمایش PCR در دو سری لوله های جداگانه باید انجام شود. در سری اول، جهت بررسی آلل های جهش یافته‌ی C282Y و H63D علاوه بر یک لوله برای

نمونه‌ی هر بیمار چهار لوله نیز برای کنترل های WW و WM و MM و آب در نظر بگیرید. در سری دوم به جهت بررسی آلل سالم علاوه بر یک لوله برای نمونه‌ی هر بیمار، چهار لوله نیز برای کنترل های WW و WM و MM و آب در نظر بگیرید و به تعداد مورد نیاز لوله ها را روی بلوک آلومینیوم سرد بگذارید.

توجه داشته باشید تعیین ژنوتایپ نمونه ها توسط دستگاه تنها در صورتی ممکن خواهد بود که هر چهار شاهد *MM*، *WM*، *WW* و آب یا شاهد بدون *DNA* در آزمایش استفاده شده باشند.

به هرلوله سری اول، ۲۰ میکرولیتر از 282/63 M Mix و به هر لوله سری دوم، ۲۰ میکرولیتر از 282/63 W Mix اضافه نمایید. سپس ۵ میکرولیتر از DNA نمونه و یا کنترل ها یا آب به هر لوله اضافه کنید و درپوش لوله ها را ببندید. سپس آنها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: در صورت استفاده از دستگاه *StepOne* لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: هنگام استفاده از دستگاه *Rotor-Gene*، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها

کیت Hemochromatosis RQ جهت کار با دستگاه‌های Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

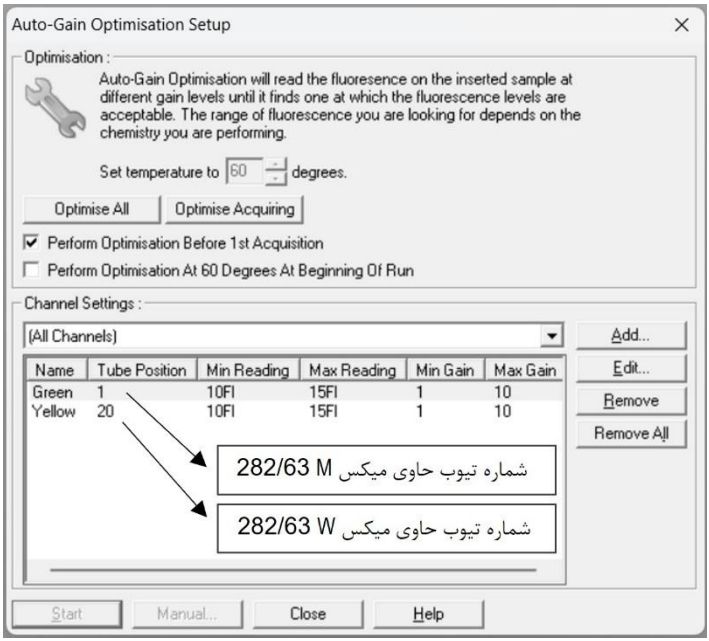
دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن با کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق وصل کنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

فایل تمپلیت Hemochromatosis را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل Hemoch 0.1 یا Hemoch 0.2 را با توجه به نوع لوله استفاده شده انتخاب کنید.

نکته: مطابق تصویر برای تنظیم ضریب تابش در منوی نرم افزار، گزینه View، سپس Gain Optimisation را انتخاب کنید. در پنجره باز شده در Auto-Gain Optimisation Setup ابتدا گزینه Optimise Acquiring را بزنید. تنظیمات را دقیقا مطابق تصویر زیر برای هر دو کانال انجام دهید.

دقت داشته باشید Tube Position را برای کانال سبز روی شماره تیوبی تنظیم کنید که حاوی میکس 282/63 M است و برای کانال زرد شماره تیوبی را ثبت نمایید که حاوی میکس 282/63 W می‌باشد.

سپس گزینه Perform Optimisation Before 1st Acquisition را فعال کنید و پنجره را ببندید.



در منوی بالای صفحه بر روی دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز بر روی دکمه استارت کلیک کنید و فایل را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه روشن شود.

در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. دقت کنید که دو صفحه جداگانه با نام های M Mix و W Mix تعریف شده اند و لوله های حاوی میکس 282/63 M فقط در صفحه M Mix و لوله های حاوی میکس 282/63 W فقط در صفحه W Mix باید نام گذاری شوند. در ستون "Type" نوع هر نمونه را نیز مشخص کنید، یعنی نمونه بیمار را با unknown، و برای شاهدها Positive Control و برای نمونه کنترل منفی نیز می‌توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

۱۸. تنظیم دستگاه StepOne

نرم افزار دستگاه را باز کنید (StepOne software 2.*). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل داخل فلش کارت همراه کیت را انتخاب کنید. (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). از منوی سمت چپ Plate Setup و سپس دکمه Assign Targets and Samples را انتخاب کنید. کنترل‌ها و چند نمونه از پیش تعریف شده اند. کنترل‌ها و تعداد نمونه مورد نظر خود را در ردیف دلخواه کپی کنید. برای این کار از گزینه های کلیک راست (copy, paste, clear) می‌توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی Define Targets and Samples می‌توانید تعداد نمونه های مورد بررسی را اضافه کنید و نام نمونه ها را مطابق نام بیماران تغییر دهید. در پایان تنظیمات دکمه Start Run را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

۱۹. تنظیم سایر دستگاه ها

چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاه های Real-Time PCR استفاده می‌کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید:

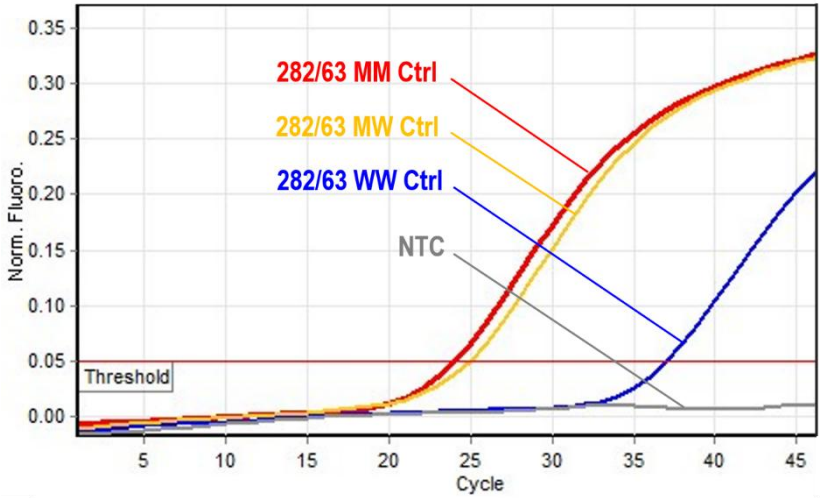
Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 3 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	45
	60°C x 60 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ های FAM و VIC تنظیم شود. PCR Mix موجود در کیت حاوی ROX می‌باشند. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می‌باشد.

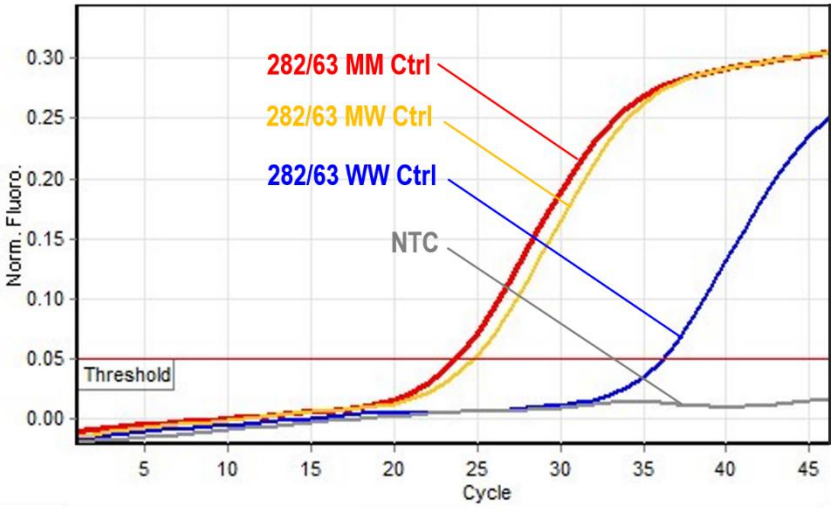
۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. آستانه را روی ۰/۰۵ قرار دهید. مراحل فوق را برای کانال Yellow تکرار کنید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار کنترل‌ها با دو میکس 282/63 M و 282/63 W تصاویر ۱ تا ۴ را ملاحظه فرمایید. توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **H63D** و افزایش **تابش زرد (Yellow)** حاصل از **C282Y** می‌باشد.

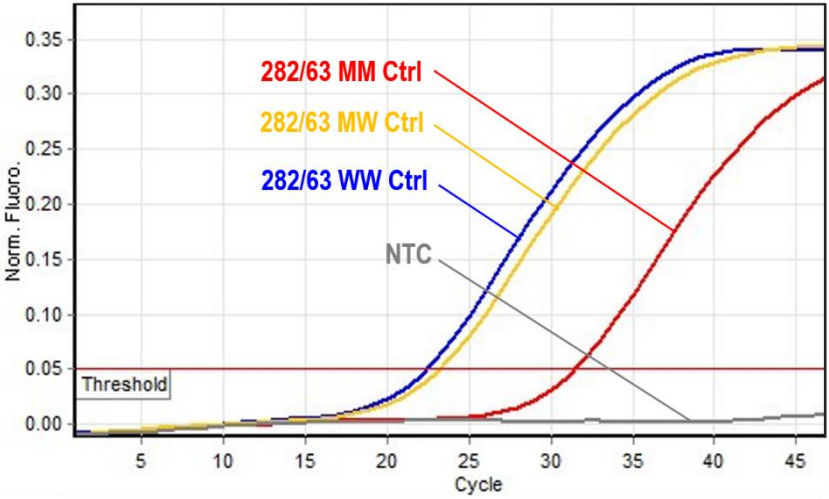
توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می‌شود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می‌باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می‌شود و CT آن (در صورت وجود) فاقد ارزش می‌باشد.



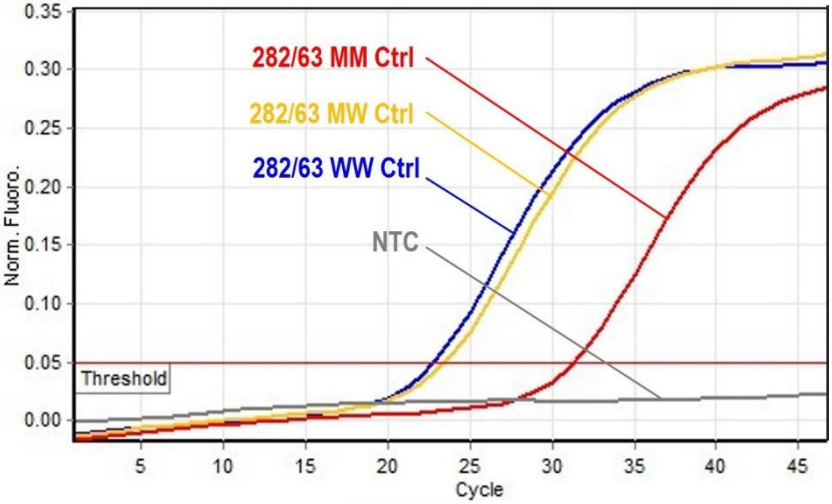
شکل ۱. منحنی کنترل ها با میکس 282/63 M در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل ۲. منحنی کنترل ها با میکس 282/63 M در کانال زرد دستگاه روتورژن



شکل ۳. منحنی کنترل ها با میکس 282/63 W در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل ۴. منحنی کنترل ها با میکس 282/63 W در کانال زرد دستگاه روتورژن

۱) در پایان تست CT های بدست آمده با هر دو میکس 282/63 M و 282/63 W در کانال های سبز و زرد را ثبت نمایید.

۲) ΔCT را برای هر جهش با توجه به فرمول زیر در هر کانال محاسبه نمایید:

For H63D: $\Delta CT_{(FAM)} = FAM\ CT_{M\ Mix} - FAM\ CT_{W\ Mix}$

For C282Y: $\Delta CT_{(VIC)} = VIC\ CT_{M\ Mix} - VIC\ CT_{W\ Mix}$

توجه: در صورتی که نمونه تا پایان تست منفی باقی بماند CT را معادل ۴۵ در نظر بگیرید.

۳) سپس نتایج را با توجه به جدول شماره ۱ تفسیر نمایید.

	ΔCT < -7	-2 < ΔCT < +4	ΔCT > +10
H63D (Green)	Pos Homozygote MM	Heterozygote WM	Neg Homozygote WW
C282Y (Yellow)	Pos Homozygote MM	Heterozygote WM	Neg Homozygote WW

جدول ۱. تفسیر نتایج ΔCT

به طور مثال نتایج CT های بدست آمده برای کنترل های کیت با دو میکس در جدول شماره ۲ ثبت شده و ΔCT آن محاسبه و تفسیر شده است. می‌توانید نتایج را برای نمونه بیمار در جدول ۲ ثبت نمایید.

	Channel	M Mix	W Mix	ΔCT	Interpretation
MM Ctrl	Green H63D	24.9	32.1	24.9 - 32.1= -7.2	ΔCT < -7 H63D MM
	Yellow C282Y	26	33.8	26 – 33.8= - 7.8	ΔCT < -7 C282Y MM

WM Ctrl	Green H63D	26	23.4	26 – 23.4 = 2.6	-2 < ΔCT < +4 H63D WM
	Yellow C282Y	27.2	25.1	27.2 – 25.1= 2.1	-2 < ΔCT < +4 C282Y WM
WW Ctrl	Green H63D	37.6	22	37.6 – 22 =15.6	ΔCT > +10 H63D WW
	Yellow C282Y	38	23.7	38 – 23.7 = 14.3	ΔCT > +10 C282Y WW
Sample	Green H63D				
	Yellow C282Y				

جدول ۲. CT و ΔCT مربوط به کنترل ها و نمونه ها

همچنین می‌توان نتایج را این چنین تفسیر کرد:

- در صورتی که اختلاف CT نمونه در کانال **سبز** با دو میکس 282/63 W و 282/63 M کمتر از ۷- باشد، نمونه از نظر جهش H63D **مثبت و هوموزیگوت Mutant** یا **MM (H63D/H63D)** می باشد.
- در صورتی که اختلاف CT نمونه در کانال **سبز** با دو میکس 282/63 W و 282/63 M عددی بیشتر از ۲- و کمتر ۴ باشد، نمونه از نظر جهش H63D **هتروزیگوت** یا **WM (H63H/H63D)** می باشد.
- در صورتی که اختلاف CT نمونه در کانال **سبز** و با دو میکس 282/63 W و 282/63 M بیشتر از ۱۰ باشد، نمونه از نظر جهش H63D **منفی و هوموزیگوت سالم** یا **WW (H63H/H63H)** می باشد.

- در صورتی که اختلاف CT نمونه در کانال **زرد** و با دو میکس 282/63 W و 282/63 M کمتر از ۷- باشد، نمونه از نظر جهش C282Y **مثبت و هوموزیگوت Mutant** یا **MM (C282Y/ C282Y)** می باشد.
- در صورتی که اختلاف CT نمونه در کانال **زرد** با دو میکس 282/63 W و 282/63 M عددی بیشتر از ۲- و کمتر ۴ باشد، نمونه از نظر جهش C282Y **هتروزیگوت** یا **WM (C282C/ C282Y)** می‌باشد.
- در صورتی که اختلاف CT نمونه در کانال **زرد** و با هر دو میکس 282/63 W و 282/63 M بیشتر از ۱۰ باشد، نمونه از نظر جهش C282Y **منفی و هوموزیگوت سالم** یا **WW (C282C/ C282C)** می‌باشد.
- در صورتی که نمونه، در هر کانال حداقل با یکی از میکس ها مثبت نشود نتیجه نامعتبر بوده و آزمایش باید **تکرار** شود. استخراج نامناسب یا خطا در تنظیم آزمایش می‌تواند دلیل چنین نتیجه ای باشد.

۲۱. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه بر روی دکمه Analysis کلیک کرده و آستانه را برای کانال FAM و VIC روی ۰/۰۵ تنظیم نمایید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار کنترل‌ها با دو میکس 282/63 M و 282/63 W تصاویر ۵ تا ۸ را ملاحظه فرمایید.

توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (FAM)** مربوط به **H63D** و افزایش **تابش زرد (VIC)** حاصل از **C282Y** می باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می‌شود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می‌باشد. در غیاب منحنی

سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می‌شود و CT آن (در صورت وجود) فاقد ارزش می‌باشد.

۱) در پایان تست CT های بدست آمده با هر دو میکس 282/63 M و 282/63 W در کانال های سبز و زرد را ثبت نمایید.

۲) ΔCT را با توجه به فرمول زیر در هر کانال محاسبه نمایید:

For H63D: $\Delta CT_{(FAM)} = FAM\ CT_{M\ Mix} - FAM\ CT_{W\ Mix}$

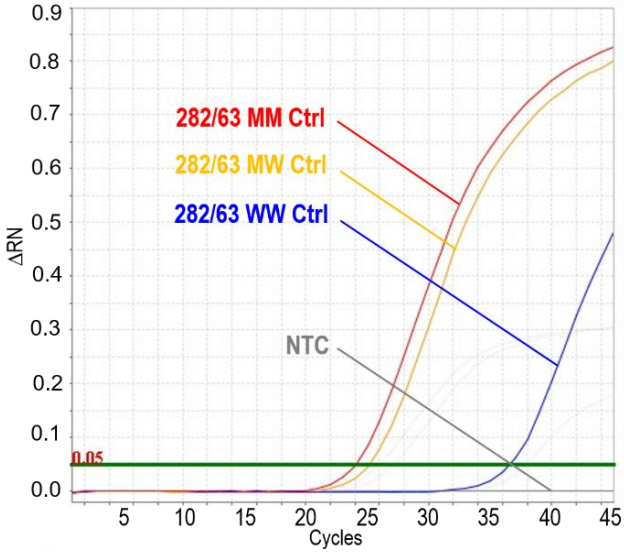
For C282Y: $\Delta CT_{(VIC)} = VIC\ CT_{M\ Mix} - VIC\ CT_{W\ Mix}$

توجه: در صورتی که نمونه تا پایان تست منفی باقی بماند CT را معادل ۴۵ در نظر بگیرید.

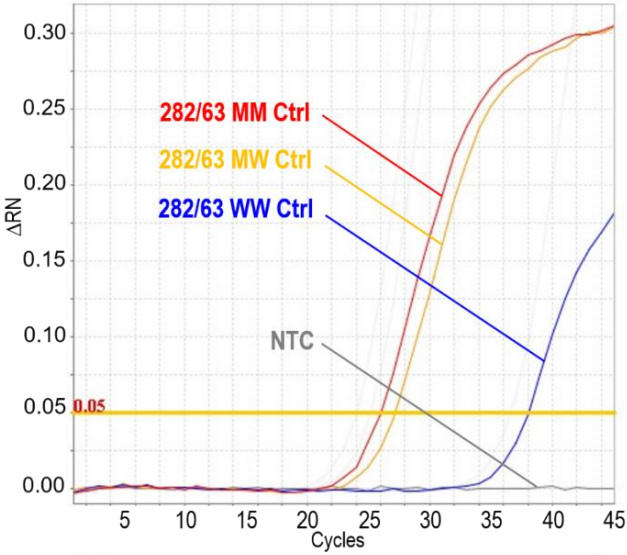
۳) سپس نتایج را با توجه به جدول ۳ تفسیر نمایید.

	ΔCT < -7	-2 < ΔCT < +4	ΔCT > +10
H63D (FAM)	Pos Homozygote MM	Heterozygote WM	Neg Homozygote WW
C282Y (VIC)	Pos Homozygote MM	Heterozygote WM	Neg Homozygote WW

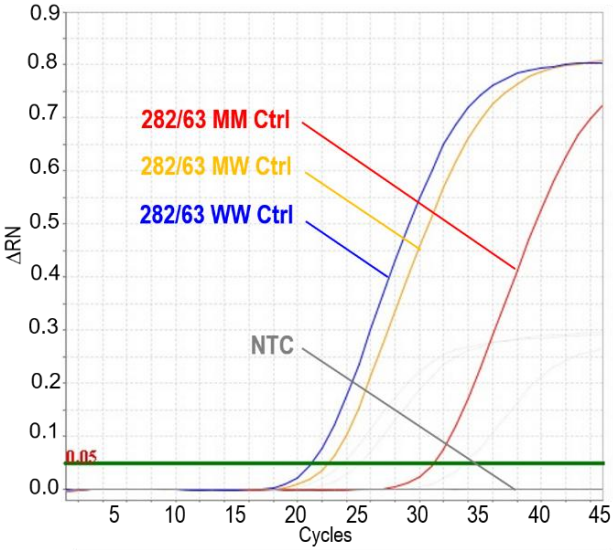
جدول ۳. تفسیر نتایج ΔCT



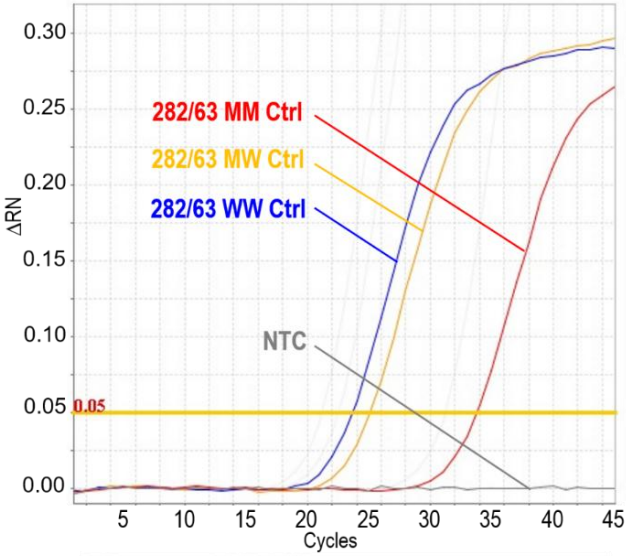
شکل ۵. منحنی کنترل‌ها با میکس 282/63 M در کانال FAM دستگاه استپ وان



شکل ۶. منحنی کنترل‌ها با میکس 282/63 M در کانال VIC دستگاه استپ وان



شکل ۷. منحنی کنترل‌ها با میکس 282/63 W در کانال FAM دستگاه استپ وان



شکل ۸. منحنی کنترل‌ها با میکس 282/63 W در کانال VIC دستگاه استپ وان

به طور مثال نتایج CT های بدست امده برای کنترل های کیت با دو میکس در جدول شماره ۴ ثبت شده و ΔCT آن محاسبه و تفسیر شده است. می‌توانید نتایج را برای نمونه بیمار در جدول ۴ ثبت نمایید.

	Channel	M Mix	W Mix	ΔCT	Interpretation
MM Ctrl	FAM H63D	24.9	32.1	24.9 - 32.1= -7.2	ΔCT < -7 H63D MM
	VIC C282Y	26	33.8	26 – 33.8= - 7.8	ΔCT < -7 C282Y MM
WM Ctrl	FAM H63D	26	23.4	26 – 23.4 = 2.6	-2 < ΔCT < +4 H63D WM
	VIC C282Y	27.2	25.1	27.2 – 25.1= 2.1	-2 < ΔCT < +4 C282Y WM
WW Ctrl	FAM H63D	37.6	22	37.6 – 22 =15.6	ΔCT > +10 H63D WW
	VIC C282Y	38	23.7	38 – 23.7 = 14.3	ΔCT > +10 C282Y WW
Sample	FAM H63D				
	VIC C282Y				

جدول ۴. CT و ΔCT مربوط به کنترل ها و نمونه ها

همچنین می‌توان نتایج را این چنین تفسیر کرد:

- در صورتی که اختلاف CT نمونه در کانال **FAM** با دو میکس W 282/63 و M 282/63 کمتر از ۷- باشد، نمونه از نظر جهش H63D **مثبت و هوموزیگوت Mutant** یا **MM (H63D/H63D)** می باشد.

- در صورتی که اختلاف CT نمونه در کانال **FAM** با دو میکس 282/63 W و 282/63 M عددی بیشتر از ۲- و کمتر ۴ باشد، نمونه از نظر جهش H63D **هتروزیگوت** یا **WM (H63H/H63D)** می باشد.
- در صورتی که اختلاف CT نمونه در کانال **FAM** و با دو میکس 282/63 W و 282/63 M بیشتر از ۱۰ باشد، نمونه از نظر جهش H63D **منفی و هوموزیگوت سالم** یا **WW (H63H/H63H)** می باشد.
- در صورتی که اختلاف CT نمونه در کانال **VIC** و با دو میکس 282/63 W و 282/63 M کمتر از ۷- باشد، نمونه از نظر جهش C282Y **مثبت و هوموزیگوت Mutant** یا **MM (C282Y/ C282Y)** می باشد.
- در صورتی که اختلاف CT نمونه در کانال **VIC** با دو میکس 282/63 W و 282/63 M عددی بیشتر از ۲- و کمتر ۴ باشد، نمونه از نظر جهش C282Y **هتروزیگوت** یا **WM (C282C/ C282Y)** می‌باشد.
- در صورتی که اختلاف CT نمونه در کانال **VIC** و با هر دو میکس 282/63 W و 282/63 M بیشتر از ۱۰ باشد، نمونه از نظر جهش C282Y **منفی و هوموزیگوت سالم** یا **WW (C282C/ C282C)** می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در هر کانال حداقل با یکی از میکس ها مثبت نشود نتیجه نامعتبر بوده و آزمایش باید **تکرار** شود. استخراج نامناسب یا خطا در تنظیم آزمایش می‌تواند دلیل چنین نتیجه ای باشد.

۲۲. روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیکی یا شیمیایی بوده و می‌توان آنها را مستقیما به سطل زباله انتقال داد. اما نمونه های عفونی آزمایشگاه را در محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت حداقل یک شبانه روز قرار دهید و سپس آنها را به سطل زباله منتقل کنید.

۲۳. پشتیبانی فنی

برای ارتباط با بخش پشتیبانی فنی می‌توانید با شماره تلفن یا آدرس ایمیل زیر تماس حاصل فرمایید:

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱

Info@novingene.com

۲۴. اطلاعات تماس

شرکت نوین ژن پارس ویرا

آدرس: تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶

تلفن تماس:

۰۲۱-۸۸۸۳۷۳۹۳

۰۹۹۰۱۸۱۳۱۲۴

ایمیل: info@novingene.com

وبسایت: www.novingene.ir

۲۵. منابع

- Barton, J.C. and Edwards, C.Q., 2000. Hemochromatosis: genetics, pathophysiology, diagnosis and treatment. Cambridge: Cambridge University Press.
- Brissot, P., Troadec, M.B., Bardou-Jacquet, E., Le Lan, C., Jouanolle, A.M., Deugnier, Y. and Loreal, O., 2008. Current approach to hemochromatosis. Blood reviews, 22(4), pp.195-210.
- Mackay, Ian M., 2004. "Real-time PCR in the microbiology laboratory." Clinical microbiology and infection 10, no. 3: 190-212.

- Pietrangelo, A., 2006. Hereditary hemochromatosis. Annu. Rev. Nutr., 26, pp.251-270.

۲۶. توضیحات برچسب

RUO	جهت مصارف پژوهشی		تولید کننده		دستورالعمل برای استفاده را بررسی نمایید
LOT	کدبهر (شماره بچ)	Σ	تعداد <n> آزمون کافی		تاریخ انقضاء
REF	شماره کاتالوگ	SN	شماره سریال	-10°C -30°C	محدوده دمایی

برای دریافت اطلاعات و منابع بیشتر، به وبسایت ما به نشانی www.novingene.ir مراجعه فرمایید یا با پشتیبانی تماس بگیرید.

Hemochromatosis RQ Kit Manual

Autumn 2025, Version 1.1

For Real-Time PCR Detection of H63D, C282Y mutations
For Research Use Only

24 (Cat# HMCHRQ24)
48 (Cat# HMCHRQ48)
96 (Cat# HMCHRQ96)
NG-WI-ASL-50-101

RUO

NovinGene ParsVira
No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.

Novin Gene

Table of Contents

1. Introduction 3
2. Intended Use 3
3. Background Information 3
4. Test Principle 3
5. Kit Contents 3
6. Packaging models 4
7. Storage and Stability 4
8. Product Use Limitations 4
9. Additionally Required Materials 5
10. General Precautions 5
11. Specimen, Storage and Transport 6
12. Interfering Substances 6
13. Internal Control 6
14. DNA Isolation 6
15. PCR Protocol 7
16. Devices and software 7
17. Programming Rotor-Gene 7
18. Programming StepOne 9

19. Programming Other Machines 9
20. Data Analysis: Rotor-Gene 9
21. Data Analysis: StepOne 14
22. Disposal Method 19
23. Technical Support 19
24. Contact Information 19
25. References 19
26. Symbols 20

1. Introduction

Hemochromatosis RQ kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting H63D and C282Y mutations. All required reagents are included in the PCR Mix provided in the kit.
This kit is for Research Use Only!

2. Intended Use

Hemochromatosis RQ kit is intended for detecting of H63D and C282Y mutations in human DNA. Detection is achieved using Real-Time PCR and is compatible with Rotor-Gene, StepOne and MIC machines.

3. Background Information

Hereditary Hemochromatosis is a disorder resulted from iron overload in tissues. Some mutations on HFE gene, mostly H63D, C282Y and S65C can lead to this disease. Clinical features vary and may involve liver, heart, endocrine glands and skin.

4. Test Principle

The target sequence is detected using PCR, where primers specific to the target sequence amplify it. Real-Time PCR facilitates the detection of the amplified product through fluorescent-labeled probes. Therefore, monitoring fluorescence provides a means for detecting the target without requiring post-amplification analysis. This eliminates the possibility of PCR product contamination.

5. Kit Contents

The kit contains a manual, a flash card and the following

reagents:

Label	Content	Quantity
282/63 M RQ Mix	PCR Mix* for 282/63 Mix	480 µl
282/63 W RQ Mix	PCR Mix* for Wild Type Mix	480 µl
282/63 MM Ctrl	Homozygous Positive Control	50 µl
282/63 WM Ctrl	Heterozygous Positive Control	50 µl
282/63 WW Ctrl	Negative Control	50 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

*1, 2 or 4 tubes for 24, 48 or 96 reaction kits.

6. Packaging models

The kit is available in 24, 48, and 96 reactions of 25 microliters.

7. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiration date mentioned. Avoid repeated freeze-thaw more than three times to prevent reduced sensitivity.

8. Product Use Limitations

- This kit is intended to be used only by specially instructed and trained personnel.
- The User manual should be strictly followed, and any modification will invalidate the results.
- The kit and its contents should not be used past the expiration date on the package.
- The kit and its contents should not be used if there is any sign of pink or red color on the Warm Mark label.
- This kit is for Research use only and is not validated for IVD (in vitro diagnostics) applications.

9. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and the accessory computer
- Tabletop microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters and nuclease-free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease-free 1.5ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

10. General Precautions

To prevent false results, always pay attention to the following points:

- Treat all samples as potentially infectious.
- Within the pre-PCR work area, assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction, b) Reagent preparation where the PCR mix is aliquoted into tubes, and c) Reaction preparation area for addition of templates to the tubes.
- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.
- Thaw kit components on crushed ice completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice after.
- Keep PCR Mix at -20°C at all times. Take it out just before use and return it to freezer immediately after.
- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cold blocks instead.

11. Specimen, Storage and Transport

Whole blood (0.5ml) is the preferred sample. Peripheral blood should be collected in sterile condition in proper and sterile tubes. We recommend EDTA or Citrate as anticoagulant. Whole blood should be shipped and stored at +4°C (stable for a 48 hours). For longer terms, sample should be aliquoted and stored at -20°C which is stable for a few months.

12. Interfering Substances

Heparin (more than 10 IU/ml) affects the PCR. Blood collected in heparin containing tubes and samples of heparinized patients must not be used.
Elevated levels of bilirubin (≤4.5 mg/dl) and lipids (≤1000 mg/dl) and hemolytic samples do not influence the extraction and PCR.

13. Internal Control

This kit detects two mutations H63D and C282Y Since each person carries wild type, mutant or both alleles, it serves as both the target and the Internal Control for the assay. Any sample should always be positive for at least one of them. If a sample is negative for both alleles, then the test should be repeated.

14. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend using following:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat. no. 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany).
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany.

Extracted sample should contain 15 ng/ul DNA, although 1-50

ng/ul DNA will also work.

15. PCR Protocol

Thaw the reagents on crushed ice completely, followed by a brief mixing and a quick spin. This kit includes two mixes **282/63 M** Mix which detect mutant alleles and **282/63 W mix** which detect Wild alleles. Each sample should be examined with both 282/63 M Mix (For Mutant alleles) and 282/63 W Mix (for Wild Type alleles) in two separate set of reactions. In each set, consider 1 tube for each sample, plus four tubes for controls and NTC.
Place the required number of microtubes on a cold block.
Pipette 20µl of 282/63 M Mix to the first series of tubes and 20ul of 282/63 W Mix to each tube of second series followed by adding 5ul of controls, or sample DNA and NTC.
Cap the tubes and visually inspect to ensure all are capped securely. Place the tubes in the machine.
Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.
Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring too.
Please note that genotype of the samples can be called only if all the four controls provided with kit are used in each test!

16. Devices and software

Hemochromatosis RQ kit is designed to work with Rotor-Gene, StepOne and MIC.

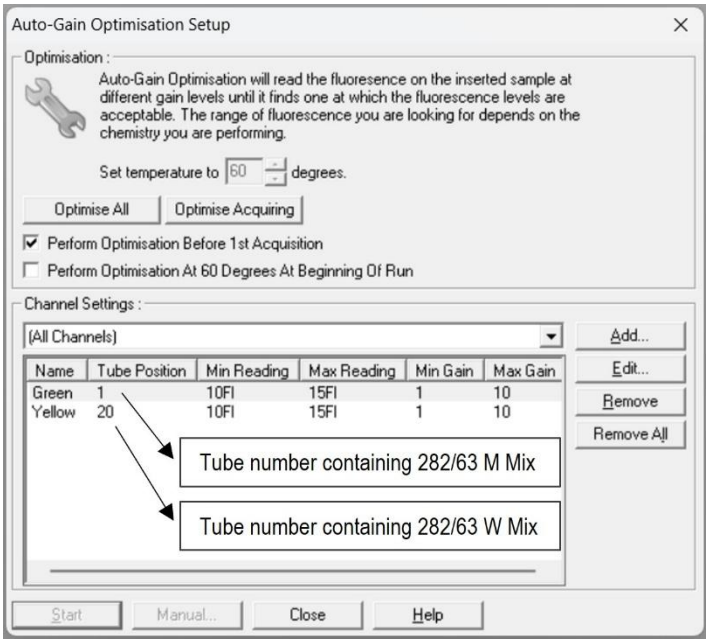
17. Programming Rotor-Gene

- Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring to the rotor!
Open the Hemochromatosis template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); Hemoch 0.1 is for strip tubes and Hemoch 0.2 is for 0.2ml tubes.

Program starts.

Note: For Gain Optimisation, in the View menu select the Gain Optimisation. Adjust the setting according to the below image.

Select a tube number containing 282/63 M Mix for the Green channel and tube with 282/63 W Mix for the Yellow channel.



Click on the Start button (Green button on the top menu). On the pop-up window click Start again and save the file to start the machine.

Edit sample names on both M Mix and W Mix pages. Remember that tubes containing 282/63 M Mix should only be named in M Mix page and tubes containing 282/63 W Mix should only be named in W Mix page.

18. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set-Up menu, click Template (provided in the flash card, or accessible by kit QR code). Click on "Plate Setup". Controls and a few samples are defined. You may change the plate setup using right-click options (copy, past, clear). You may also add or remove samples on “Define Targets and Samples” menu. When finished, click on “Start Run” and save the experiment on the desired location. Instrument will start shortly.

19. Programming Other Machines

If you apply this kit to other Real-Time PCR machines, program it according to the following table:

Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 3 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	45
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM and VIC dyes. PCR Mix contains ROX with the final concentration of 300nM in the reaction.

20. Data Analysis: Rotor-Gene

Analyze data according to Rotor-Gene manual. Perform qualitative analysis for **H63D (the FAM channel)** and **C282Y (the VIC channel)**. Briefly, click on the “Analysis" menu and then under the “Quantitation" tab, double click on "Cycling A. Green". Close the pop-up for Automatic Threshold and set the threshold to 0.05. Repeat the above for "Cycling A. Yellow" both for 282/63 W Mix and 282/63 M Mix, refer to figures 1 to 4 for typical graphs.

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used. In the absence of a sigmoid graph and log phase, the sample is considered Negative, and CT, if present, is not reliable.

1) Document the CTs of sample for both 282/63 W Mix and 282/63 M Mix in the Green and Yellow channels.
2) Calculate ΔCT through the following equation:

For H63D: $\Delta CT_{(FAM)} = FAM\ CT_{M\ Mix} - FAM\ CT_{W\ Mix}$

For C282Y: $\Delta CT_{(VIC)} = VIC\ CT_{M\ Mix} - VIC\ CT_{W\ Mix}$

Note! If a sample remains negative in a channel, use CT of 45 for calculation.

3) Interpretation ΔCT of sample, with Table 1.

	ΔCT < -7	**-2 < ΔCT < +4**	**ΔCT > +10**
H63D (Green)	Pos Homozygote MM	Heterozygote WM	Neg Homozygote WW
C282Y (Yellow)	Pos Homozygote MM	Heterozygote WM	Neg Homozygote WW

Table 1. Interpretation of results

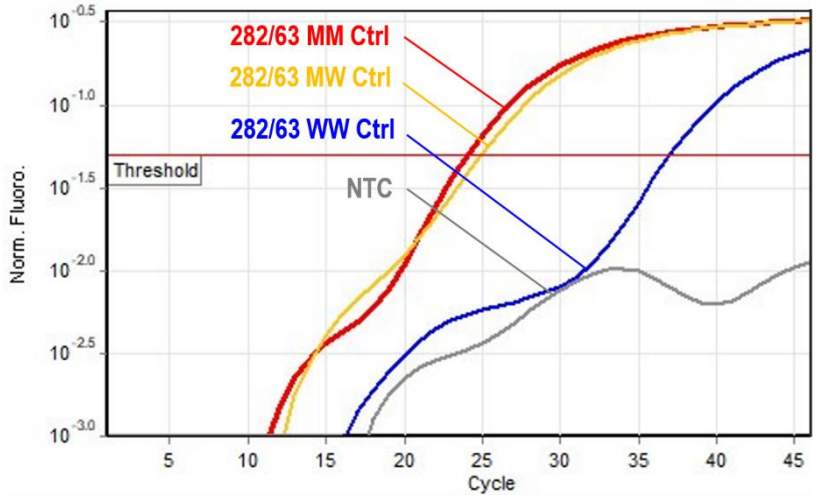


Fig 1. Typical Control graph with 282/63 Mix in Green channel for Rotor-Gene

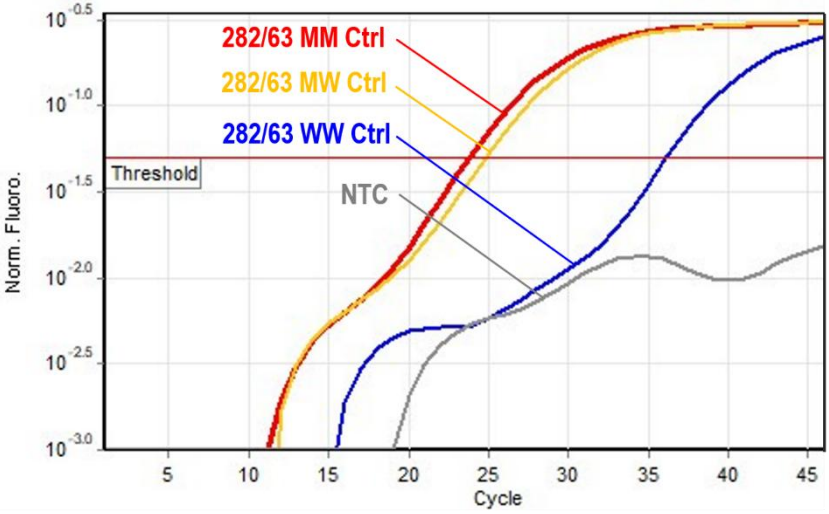


Fig 2. Typical Control graph with 282/63 M Mix in Yellow channel for Rotor-Gene

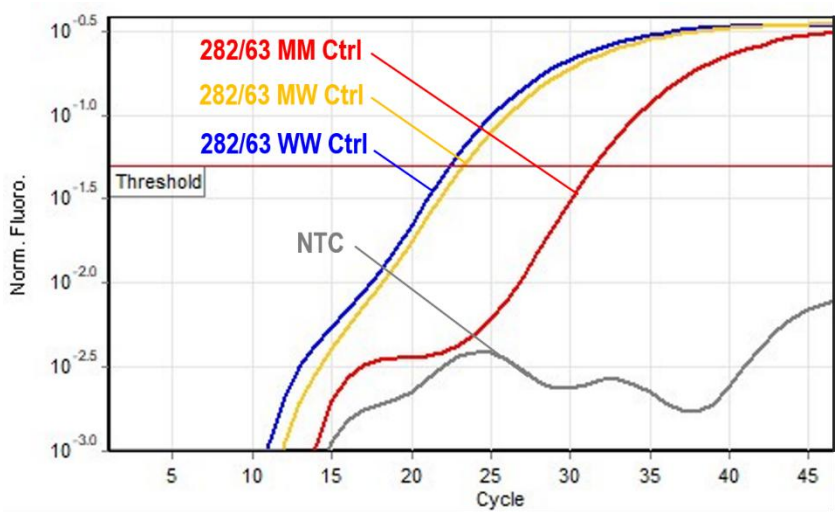


Fig 3. Typical Control graph with 282/63 W Mix in Green channel for Rotor-Gene

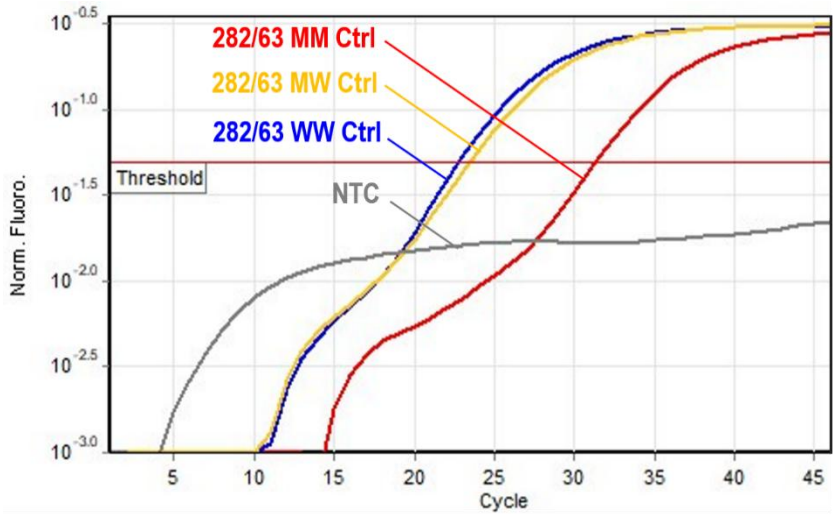


Fig 4. Typical Control graph with 282/63 W Mix in Yellow channel for Rotor-Gene

As an example, CTs of Controls are documented on Table 2 and ΔCT calculated for each one. Document CTs of patient's sample on Table 2 to interpretate with Table 1.

	Channel	M Mix	W Mix	ΔCT	Interpretation
MM Ctrl	Green H63D	24.9	32.1	24.9 - 32.1= -7.2	ΔCT < -7 H63D MM
	Yellow C282Y	26	33.8	26 – 33.8= - 7.8	ΔCT < -7 C282Y MM
WM Ctrl	Green H63D	26	23.4	26 – 23.4 = 2.6	-2 < ΔCT < +4 H63D WM
	Yellow C282Y	27.2	25.1	27.2 – 25.1= 2.1	-2 < ΔCT < +4 C282Y WM
WW Ctrl	Green H63D	37.6	22	37.6 – 22 =15.6	ΔCT > +10 H63D WW
	Yellow C282Y	38	23.7	38 – 23.7 = 14.3	ΔCT > +10 C282Y WW
Sample	Green H63D				
	Yellow C282Y				

Table 2. CT and ΔCT for controls and samples

- If a sample ΔCT with 282/63 W Mix and 282/63 M Mix in the **Green** channel is less than -7, sample is Positive and **Homozygote MM (H63D/H63D).**
- If a sample ΔCT with 282/63 W Mix and 282/63 M Mix in the **Green** channel is less than 4 and more than -2, sample is **Heterozygote WM (H63H/H63D).**
- If a sample ΔCT with 282/63 W Mix and 282/63 M Mix in the **Green** channel is more than 10, sample is **Homozygote Wild type or WW (H63H/H63H).**

- If a sample ΔCT with 282/63 W Mix and 282/63 M Mix in the **Yellow** channel is less than -7, sample is Positive and **Homozygote MM (C282Y/ C282Y).**
- If a sample ΔCT with 282/63 W Mix and 282/63 M Mix in the **Yellow** channel less than 4 and more than -2, sample is **Heterozygote WM (C282C/ C282Y).**
- If a sample ΔCT with 282/63 W Mix and 282/63 M Mix in the **Yellow** channel is more than 10, sample is **Homozygote Wild type or WW (C282C/ C282C).**
- If a sample is negative for both alleles, then results are **inconclusive,** and the test should be repeated. Improper extraction could cause that.

21. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to StepOne manual. Briefly, click on "Analyze" and set the threshold at 0.05 for **H63D (the FAM channel)** and **C282Y (the VIC channel)** do this for both 282/63 M Mix and 282/63 W Mix. Refer to figures 5 to 8 for typical graphs.

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used. In the absence of a sigmoid graph and log phase, the sample is considered Negative, and CT, if present, is not reliable.

1) Document the CTs of sample for both 282/63 W Mix and 282/63 M Mix in the FAM and VIC channels.
2) Calculate ΔCT through the following equation.

For H63D: $\Delta CT_{(FAM)} = FAM\ CT_{M\ Mix} - FAM\ CT_{W\ Mix}$

For C282Y: $\Delta CT_{(VIC)} = VIC\ CT_{M\ Mix} - VIC\ CT_{W\ Mix}$

Note! If a sample remains negative in a channel, use CT of 45 for

calculation.

3) Interpretation sample ΔCT with Table 3.

	ΔCT < -7	-2 < ΔCT < +4	ΔCT > +10
H63D (FAM)	Pos Homozygote MM	Heterozygote WM	Neg Homozygote WW
C282Y (VIC)	Pos Homozygote MM	Heterozygote WM	Neg Homozygote WW

Table 3. Interpretation of results

As an example, CTs of Controls are documented on Table 4 and ΔCT calculated for each one. Document CTs of patient's sample on Table 4 to interpretate with Table 3.

	Channel	M Mix	W Mix	ΔCT	Interpretation
MM Ctrl	FAM H63D	24.9	32.1	24.9 - 32.1= -7.2	ΔCT < -7 H63D MM
	VIC C282Y	26	33.8	26 – 33.8= - 7.8	ΔCT < -7 C282Y MM
WM Ctrl	FAM H63D	26	23.4	26 – 23.4 = 2.6	-2 < ΔCT < +4 H63D WM
	VIC C282Y	27.2	25.1	27.2 – 25.1= 2.1	-2 < ΔCT < +4 C282Y WM
WW Ctrl	FAM H63D	37.6	22	37.6 – 22 =15.6	ΔCT > +10 H63D WW
	VIC C282Y	38	23.7	38 – 23.7 = 14.3	ΔCT > +10 C282Y WW
Sample	FAM H63D				
	VIC C282Y				

Table 4. CT and ΔCT for controls and samples

- If a sample ΔCT with 282/63 W Mix and 282/63 M Mix in the **FAM** channel is less than -7, sample is Positive and **Homozygote MM (H63D/H63D).**
- If a sample ΔCT with 282/63 W Mix and 282/63 M Mix in the **FAM** channel is less than 4 and more than -2, sample is **Heterozygote WM (H63H/H63D).**
- If a sample ΔCT with 282/63 W Mix and 282/63 M Mix in the **FAM** channel is more than 10, sample is **Homozygote Wild type or WW (H63H/H63H).**
- If a sample ΔCT with 282/63 W Mix and 282/63 M Mix in the **VIC** channel is less than -7, sample is Positive and **Homozygote MM (C282Y/ C282Y).**
- If a sample ΔCT with 282/63 W Mix and 282/63 M Mix in the **VIC** channel less than 4 and more than -2, sample is **Heterozygote WM (C282C/ C282Y).**
- If a sample ΔCT with 282/63 W Mix and 282/63 M Mix in the **VIC** channel is more than 10, sample is **Homozygote Wild type or WW (C282C/ C282C).**
- If a sample is negative for both alleles, then results are **inconclusive,** and test should be repeated. Improper extraction could cause that.

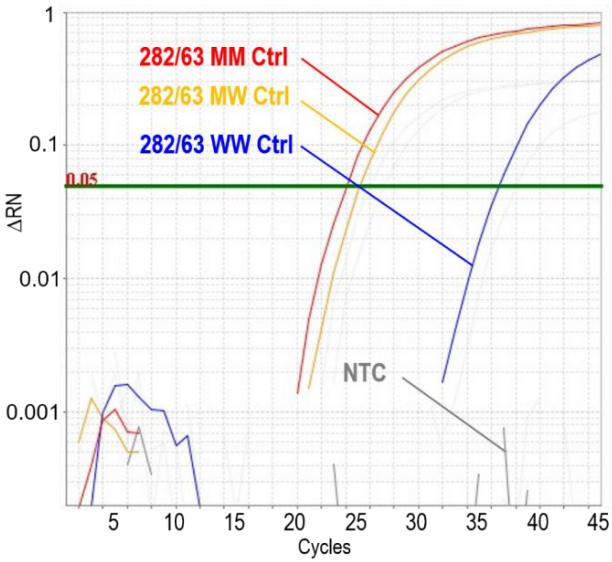


Fig 5. Typical Control graph with 282/63 M Mix in FAM channel for StepOne

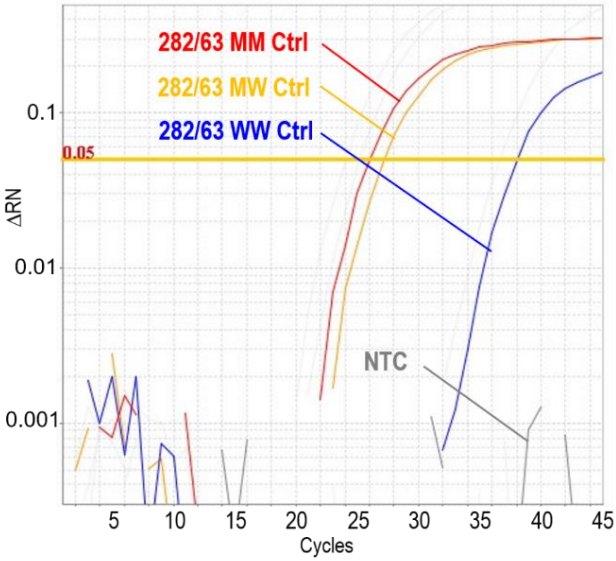


Fig 6. Typical Control graph with 282/63 M Mix in VIC channel for StepOne

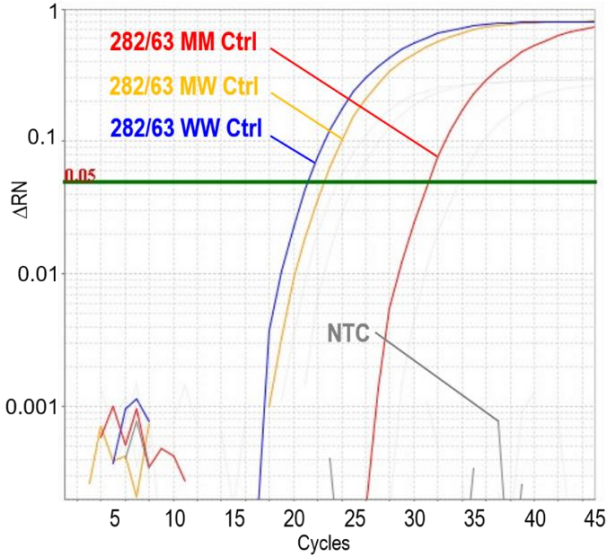


Fig 7. Typical Control graph with 282/63 W Mix in FAM channel for StepOne

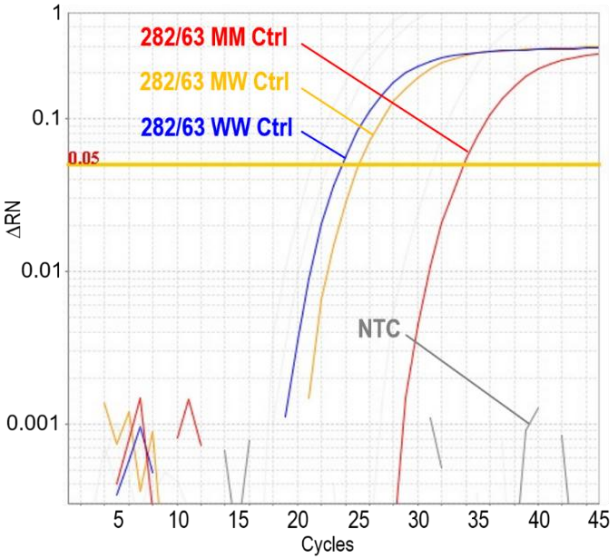


Fig 8. Typical Control graph with 282/63 W Mix in VIC channel for StepOne

22. Disposal Method

The contents of the kit do not require any special treatment before disposal and can be directly discarded. Infectious specimens should be maintained in 5% Sodium Hypochlorite overnight and then discarded.

23. Technical Support

For technical support, contact us via
Phone +98-9936223241
Email: info@novingene.com

24. Contact Information

NovinGene ParsVira
Address: No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.
Tel: +98 21-88837393
+98 990 -1813124
Email: info@novingene.com
Website: www.novingene.com

25. References

- Barton, J.C. and Edwards, C.Q., 2000. Hemochromatosis: genetics, pathophysiology, diagnosis and treatment. Cambridge: Cambridge University Press.
- Brissot, P., Troadec, M.B., Bardou-Jacquet, E., Le Lan, C., Jouanolle, A.M., Deugnier, Y. and Loreal, O., 2008. Current approach to hemochromatosis. Blood reviews, 22(4), pp.195-210.
- Mackay, Ian M., 2004. "Real-time PCR in the microbiology laboratory." Clinical microbiology and infection 10, no. 3: 190-212.

- Pietrangelo, A., 2006. Hereditary hemochromatosis. Annu. Rev. Nutr., 26, pp.251-270.

26. Symbols

RUO Research use only	Manufacturer	Consult instructions for use
LOT Lot number	Content sufficient for <n> tests	Use-by date
REF Catalogue number	SN Serial number	-10°C -30°C Temperature limit

For more information and resources please visit our website; www.novingene.com