

راهنمای کیت

Hemochromatosis RQ

کیت Hemochromatosis RQ به منظور تشخیص جهش‌های H63D و C828Y در DNA انسانی و جهت کار با دستگاه‌های Rotor-Gene، StepOne، و MIC به روش Real-Time PCR می‌باشد. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی طراحی شده است.

محتویات کیت: این کیت شامل یک راهنما و مواد زیر می‌باشد:

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 جهش یافته)	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

تمامی مواد کیت باید در دمای ۱۰ تا ۳۰ درجه زیر صفر نگهداری شوند.

کنترل داخلی: با توجه به اینکه دو ژن H63D و C282Y در این کیت بررسی می‌شود و هر فرد حامل ژن‌های 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 آлл‌ها 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.

روش استفاده: هر نمونه باید با هر دو میکس **282/63 M** جهت بررسی آلل های جهش یافته و **282/63 W** جهت بررسی آلل های 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 یافته ی **C282Y** و **H63D** علاوه بر یک لوله برای نمونه ی هر بیمار چهار لوله نیز برای کنترل های **WW** و **WM** و **MM** و آب نیز در نظر بگیرید. در سری دوم به جهت بررسی آلل های سالم علاوه بر یک لوله برای نمونه ی هر بیمار، چهار لوله نیز برای کنترل های **WW** و **WM** و **MM** و آب در نظر بگیرید علاوه بر یک تعداد مورد نیاز لوله روی بلوک آلومینیوم سرد بگذارید.

به هر لوله 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 آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

تنظیم دستگاه: برای تنظیم دستگاه Rotor-Gene یا StepOne از فایل تمپلیت مخصوص این کیت استفاده کنید. همچنین می توانید 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. میکس موجود در کیت حاوی ROX با غلظت نهایی 300nM می باشد.

آنالیز نتایج: توجه داشته باشید که افزایش تابش **FAM/Green** مربوط به **H63D** و افزایش تابش **VIC/Yellow** حاصل از **C282Y** می باشد.

همچنین نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموئیدی، نمونه منفی محسوب می شود و (CT آن) در صورت وجود فاقد ارزش می باشد.

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:

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

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

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.

	$\Delta CT < -7$	$-2 < \Delta CT < +4$	$\Delta CT > +10$
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. می توانید نتایج را برای نمونه بیمار در این جدول ثبت نمایید.

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

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

توضیحات برچسب:

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

جهت توضیحات بیشتر در مورد کیت های نوین ژن، دریافت فایل کامل دفترچه راهنمای کیت و فایل تمپلیت برای تنظیم دستگاه و آشنایی با نمایندگان فروش، به وبسایت ما به نشانی www.novingene.com مراجعه فرمایید یا QR Code موجود بر روی جعبه کیت را اسکن نمایید. جهت کسب اطلاعات بیشتر با پشتیبانی فنی تماس بگیرید.