

# gb Human B2M mRNA

Kat. č.: 3153-100  
3153-500



generi biotech

## ÚČEL POUŽITÍ

Souprava gb Human B2M mRNA umožňuje stanovení přítomnosti lidské mRNA prostřednictvím detekce genu B2M (Gene ID 567). Tento gen kóduje beta-2-microglobulin. Jde o sérový protein, který je součástí těžkých řetězců hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) I na povrchu téměř všech jaderných buněk (s výjimkou červených krvinek). Souprava slouží ke sledování kvality izolátů RNA z lidského biologického materiálu.

## PRINCIP VYŠETŘENÍ

Vyšetření je založeno na metodice **jednokrokové (one-step) RT-qPCR**. Souprava obsahuje všechny potřebné komponenty pro provedení stanovení.

## PRACOVNÍ POSTUP

### Provedení RT-qPCR

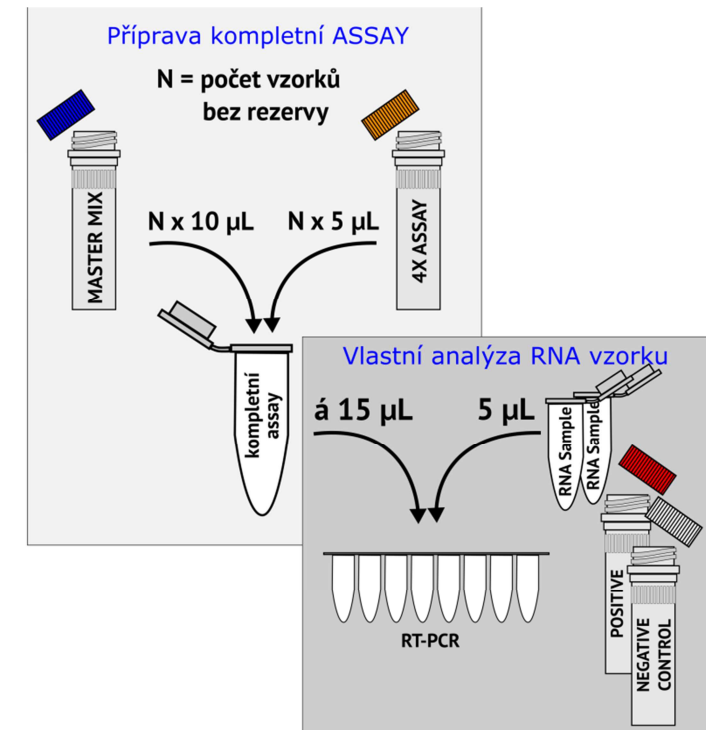
- 1) Vyjměte reagentie z krabičky a nechte je kompletně rozmraznout.
- 2) Reagentie důkladně promíchejte a krátce stočte.
- 3) Přeneste **10 µl** (\* počet vzorků) ze zkumavky **Master Mix OneStep** (zkumavka s modrým víčkem) a **5 µl** (\* počet vzorků) **Assay hB2M mRNA** (zkumavka s oranžovým víčkem) do nové zkumavky, řádně promíchejte, stočte a označte datem přípravy. Takto připravíte **kompletní assay**. Se směsí zacházejte dle instrukcí uvedených v kapitole Podmínky skladování a manipulace.
- 4) Připravenou kompletní assay rozpipetujte po **15 µl** do zkumavek určených pro cyklér nebo do jamek plata.
- 5) K assayi přidejte **5 µl** vzorku templátu a krátce stočte.
  - V jednotlivých runech je pro správné vyhodnocení nutná analýza **Standard hB2M** a **Deionized Water** jako NTC kontroly.
  - Jako templát použijte RNA izolovanou z biologického materiálu.
  - RNA analyzujte co nejdříve po izolaci.
- 6) Analýzu vzorků v real-time PCR cykléru proveďte bezprostředně po přípravě reakcí.

## Amplifikační protokol a sběr dat

- Na real-time PCR cykléru nastavte následující teplotní profil:

reverzní transkripce	42 °C	30 min	50 cyklů
počáteční denaturace	95 °C	3 min	
denaturace	95 °C	10 s	
annealing + elongace (+ snímání fluorescence)	60 °C	30 s	

- Celkový objem PCR reakce je **20 µl**, zohledněte tuto skutečnost při nastavení cykléru.
- Při použití přístroje Rotor-Gene je nutné nastavit **Gain** tak, aby základní fluorescence byla ve všech aktivních kanálech v rozsahu **5–10 RFU**. **Pozor** – pokud je Gain nastavován před analýzou, teplota optimalizace Gain **nesmí přesáhnout 42 °C**.
- Snímání fluorescence musí být aktivní pro kanály FAM/SYBR i HEX/JOE/VIC.
- Návod pro nastavení cykléru před spuštěním analýzy naleznete na adrese: <https://www.generi-biotech.com> v sekci „Ke stažení“ a řiďte se manuálem výrobce daného přístroje.



## ANALÝZA VÝSLEDKŮ

Vyhodnocení přítomnosti lidské mRNA v testovaném vzorku provedte na základě analýzy Ct hodnot, které získáte pomocí softwaru vašeho real-time PCR cyklu.

Signál v daném fluorescenčním kanálu odečtete jako hodnotu Ct (threshold cycle, prahový cyklus) v módu kvantifikace. **Ct hodnoty pro cílový gen odečtete v kanálu FAM, Ct hodnoty pro interní pozitivní kontrolu v kanálu HEX.** U silně pozitivních vzorků nemusí být interní pozitivní kontrola amplifikována. Pro oba aktivní kanály je nutné pro odečet nastavit **stejnou hodnotu prahové fluorescence** (threshold). Dodržujte instrukce od výrobce cyklu.

Nejprve ověřte validitu analýzy. Zobrazte signály reakcí kontrolních vzorků. Validita analýzy se hodnotí **pro každý vyšetřovaný gen zvlášť.**

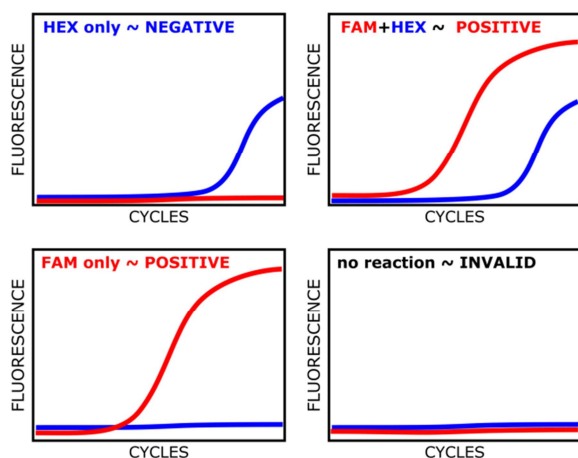
### Validita analýzy

Analýza je považována za validní, pokud signály kontrol odpovídají následujícímu rozdělení:

- Standard hB2M – signály v kanálech FAM/SYBR i HEX/JOE/VIC
- Deionized Water – signál v kanálu HEX/JOE/VIC

Pokud je analýza potvrzena jako validní, pokračujte s hodnocením vzorků. V opačném případě postupujte dle doporučení uvedených v kapitole Řešení potíží.

Příklad výstupu vzorků – signály v kanálech FAM/SYBR (červená křivka) a HEX/JOE/VIC (modrá křivka):



## Interpretace výsledků

Základním výstupem analýzy dat je určení přítomnosti lidské mRNA (tj. pozitivita vzorku).

Výsledek	FAM	HEX
Pozitivní	+	+/-
Negativní	-	+
nevalidní (falešně negativní)	-	-

Soupravu lze využít také ke sledování kvality izolátů lidské RNA. **Pokud je analýza validní, avšak lidský gen B2M není detekován (tj. výsledek je Negativní), lze předpokládat zhoršenou kvalitu a kvantitu izolované RNA, například v důsledku nesprávně provedeného odběru biologického materiálu nebo selhání izolačních postupů.**

Pokles efektivity odběru biologického materiálu nebo výtěžnosti izolace se nemusí projevit úplnou absencí signálu, ale vzestupem Ct hodnoty. Kritéria pro přijetí nebo vyloučení vzorku jsou závislá na odběrové praxi konkrétního pracoviště a použitím izolačním postupu a jejich nastavení je zcela v kompetencích pracoviště provádějícího vyšetření vzorku RNA.

## ŘEŠENÍ POTÍŽÍ

Výsledky testování mohou být považovány za správné pouze v případě dodržení instrukcí uváděných v příloženém manuálu. V případě nesprávných výsledků kontrolních vzorků zkontrolujte:

- datum expirace soupravy
- podmínky skladování a manipulace
- nastavení pipet a cyklu

Zjištění:	Návrh řešení:
V reakci negativní kontroly (Deionized Water) je detekován signál v kanálu FAM.	Pravděpodobně došlo ke kontaminaci reakcí templátem. Zopakujte analýzu.
V reakci negativní kontroly je pomocí jedné detekční assaye opakovaně detekován signál v kanálu FAM.	Pravděpodobně došlo ke kontaminaci assaye templátem. Zopakujte analýzu s novým alikvótem dané assaye.
V reakci negativní kontroly je opakovaně detekován signál všech assayí v kanálu FAM.	Pravděpodobně došlo ke kontaminaci komponenty Deionized Water templátem. Zopakujte analýzu s ultračistou vodou z jiného zdroje.
Standard hB2M nebyl detekován nebo byl detekován pouze v jednom kanálu.	Pravděpodobně došlo k pipetovací chybě. Zopakujte analýzu.
U vyšetřovaného vzorku nebyl naměřen signál ani v kanálu FAM, ani v kanálu HEX, ačkoliv analýza je vyhodnocena jako validní.	Selhání analýzy bylo pravděpodobně způsobeno inhibicí PCR. Proveďte analýzu s novým izolátem RNA.

## SLOŽENÍ A POPIS KOMPONENT SOUPRAVY

Komponenta <sup>1)</sup>	Objem	Počet <sup>2)</sup>	Koncentrace
● Assay hB2M mRNA	0,5 ml <sup>3)</sup>	1   5	4×
● Master Mix OneStep	1,0 ml <sup>3)</sup>	1   5	2×
● Standard hB2M	0,2 ml	1   1	1×10 <sup>3</sup> kopií/μl
○ Deionized Water	1,0 ml	1   1	

<sup>1)</sup> Barva víčka na zkumavce odpovídá typu reagentie.

<sup>2)</sup> Počet uveden pro balení po 100 | 500 reakcích.

<sup>3)</sup> Objem odpovídá 100 PCR reakcím o objemu 20 μl.

### Assay hB2M mRNA

Assay hB2M mRNA je směs amplifikačních primerů a fluorescenčně značených sond. Sondy umožňují detekci **cílového genu v kanálu FAM**;  $\lambda_{\text{EXCITACE}} = 495 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{EMISE}} = 520 \text{ nm}$  a detekci **interní pozitivní kontroly v kanálu HEX**;  $\lambda_{\text{EXCITACE}} = 535 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{EMISE}} = 556 \text{ nm}$ . V přítomnosti cílového genu můžeme tedy zaznamenat dva signály, zatímco za jeho nepřítomnosti zaznamenáme pouze signál interní pozitivní kontroly v kanálu HEX. Assay je dodána ve zkumavce s oranžovým víčkem. Smícháním s Master Mix OneStep získáte kompletní assay určenou k okamžitému použití.

### Master Mix OneStep

Master Mix OneStep ve zkumavce s modrým víčkem je optimalizovaná směs pufru, polymerázy a nukleotidů, která je nezbytná pro průběh RT-qPCR.

### Standard hB2M

Standard hB2M slouží jako pozitivní kontrola k ověření validity analýzy. Je dodán ve zkumavce s červeným víčkem. Při manipulaci s pozitivní kontrolou pracujte tak, aby nedošlo ke kontaminaci jiných částí soupravy a analyzovaných vzorků.

### Deionized Water

Deionizovaná voda slouží jako kontrola bez templátu (NTC – no template control). Je dodávána ve zkumavce s transparentním víčkem.

## Reagentie a vybavení, které nejsou součástí soupravy

- souprava či reagentie na izolaci RNA
- jednorázové plastové zkumavky, stripy nebo plata vhodná pro real-time PCR cyklér
- nastavitelné mikropipety s odpovídajícím rozsahem
- jednorázové pipetovací špičky s filtrem
- laboratorní vortex a centrifuga
- real-time PCR cyklér se softwarem

## VAROVÁNÍ A OPATŘENÍ

### Podmínky skladování a manipulace

- Po obdržení skladujte všechny komponenty soupravy při teplotě pod **-20 °C**.
- Assay je citlivá na světlo, omezte manipulaci na světle na nejkratší možnou dobu.
- Reagentie jsou určeny pro práci při laboratorní teplotě.
- Jednotlivé komponenty soupravy rozmrazte a znovu zmrazte **maximálně 5×**. Kompletní assay vzniklou po smíchání Master Mix OneStep a Assay hB2M mRNA již nezmrazujte. Takto vzniklá směs je určena na **jedno použití**.
- Při dodržení uvedených podmínek je souprava stabilní až do data expirace, které je uvedeno na **štítku krabičky**.

### Bezpečnostní opatření

- Souprava je určena pouze pro profesionální použití.
- Při práci s RT-qPCR reagentiemi a materiálem noste vždy laboratorní oděv a ochranné rukavice.
- V případě potřísnění pokožky nebo zasažení očí reagentiemi opláchněte postižené místo pod tekoucí vodou.







## Instrukce pro použití

- Vždy používejte verzi manuálu, která je součástí soupravy. Číslo odpovídající verze je vyznačeno na štítku uvnitř krabičky.
- Nevhodné zacházení s reagentiemi či úpravy pracovního postupu mohou negativně ovlivnit výsledky, proto je třeba striktně dodržovat pipetované objemy, inkubační doby a teplotní podmínky dle uvedených instrukcí.
- Dodržujte expirační dobu soupravy uvedenou na štítku krabičky.
- Nekombinujte komponenty z různých šarží souprav.
- V případě, že je po doručení některá z komponent soupravy poškozená, nepoužívejte ji a neprodleně kontaktujte výrobce. Uschovejte pro případnou reklamaci.
- Používejte kalibrované pipety a přístroje.
- Likvidaci veškerého odpadu provádějte dle platných právních předpisů. Vnější obal je vyroben z papíru, vnitřní výsek z polyuretanu a zkumavky z polypropylénu. S reagentiemi lze zacházet jako s běžným odpadem. Konečný produkt PCR analýzy likvidujte způsobem zohledňujícím riziko kontaminace prostor.

### Opatření k předcházení kontaminace

- Vyhraďte prostory, vybavení, materiál a ochranné pomůcky pro izolaci DNA/RNA z klinického materiálu a jiné pro přípravu RT-qPCR reakcí.
- Vyměňte si rukavice a laboratorní oděv, kdykoli máte podezření, že jsou kontaminovány.
- Nikdy neotvírejte amplifikovaný PCR produkt v místě přípravy PCR reakcí.
- Reagentie nechávejte otevřené jen po dobu nezbytnou k přípravě PCR reakcí.
- Při pipetování použijte špičky s filtrem.
- Při přípravě reakce je třeba věnovat pozornost tomu, aby standardy nekontaminovaly žádnou další součást soupravy nebo ostatní vzorky. Tomu se lze vyhnout uzavřením všech zkumavek před manipulací se standardy.
- Pro ředění vzorků používejte ultračistou vodu. Za tímto účelem je možno využít Deionized Water, která je součástí soupravy.

## SYMBOLY POUŽITÉ NA NÁLEPKÁCH

	Číslo šarže
	Datum expirace
	Skladování při doporučené teplotě
	Obsahuje
	Výrobce
	Počet testů

## REFERENCE

Při použití soupravy se řiďte manuálem výrobce daného cykléru. Seznam cyklérů, na kterých byly testovány výkonnostní parametry soupravy, je dostupný na webových stránkách výrobce.

Pokud potřebujete doplňující informace, kontaktujte nás na e-mailové adrese [info@generi-biotech.com](mailto:info@generi-biotech.com) nebo na telefonním čísle +420 495 056 314. Další informace získáte také na našich webových stránkách [www.generi-biotech.com](http://www.generi-biotech.com).



GENERI BIOTECH s.r.o.  
Machkova 587/42  
CZ-500 11, Hradec Králové 11 – Třebeš  
CZECH REPUBLIC

[www.generi-biotech.com](http://www.generi-biotech.com)

tel.: +420 495 056 314

e-mail: [info@generi-biotech.com](mailto:info@generi-biotech.com)

**Verze manuálu: 1.1**

Datum poslední revize: 23. 4. 2020

Verze manuálu 1.1