

Version 150520 DE

# *AdnaTest* *ProstateCancerDetect*

**RT-PCR-Nachweis von Prostatakrebs-assoziiierter Genexpression in angereicherten Tumorzellen**

*Zur In-vitro-Diagnostik*

## **Gebrauchsanweisung**

**REF** T-1-521



**IVD**

## Inhaltsverzeichnis

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| Bestellinformation .....                                    | 3  |
| Anwendungszweck .....                                       | 3  |
| Abkürzungen und Symbole.....                                | 4  |
| Patente und eingetragene Markenzeichen .....                | 5  |
| Produktbeschreibung.....                                    | 6  |
| Kit-Bestandteile.....                                       | 7  |
| Vom Anwender bereitzustellen .....                          | 8  |
| Lagerung.....                                               | 9  |
| Besondere Anwendungshinweise.....                           | 10 |
| Protokoll.....                                              | 11 |
| A. Vorbereitung der Dynabeads Oligo(dT) <sub>25</sub> ..... | 11 |
| B. mRNA Isolation.....                                      | 12 |
| C. Reverse Transkription .....                              | 14 |
| D. Multiplex-PCR .....                                      | 16 |
| E. Singleplex-PCR .....                                     | 16 |
| F. Fragmentanalyse .....                                    | 20 |
| Literatur.....                                              | 23 |
| Fehlerbehebung.....                                         | 25 |
| Kurzanleitung.....                                          | 26 |

## **Bestellinformation**

Detaillierte Informationen über unsere Produkte und die Adressen unserer Distributoren finden Sie auf unserer Webseite unter [www.adnagen.com](http://www.adnagen.com). Unsere Distributoren unterstützen Sie gern bei allen Belangen rund um die Anwendung unserer Testsysteme.






Sollten Sie weitere Fragen zum *AdnaTest* haben, hilft Ihnen unser Team gerne weiter ([support@adnagen.com](mailto:support@adnagen.com)).

## **Anwendungszweck**

Der *AdnaTest ProstateCancerDetect* dient dem Nachweis von Prostatakrebs-assoziiierter Genexpression in immunomagnetisch angereicherten Tumorzellen mittels reverser Transkription und PCR und ist für die In-vitro-Diagnostik bestimmt. Der Nachweis erfolgt dabei mit einer Spezifität von mindestens 90%. Die Wiederfindung von 5 Zellen in 5 ml Vollblut liegt in Spiking-Experimenten bei mindestens 90%, die Wiederfindung von 2 Zellen in 5 ml Vollblut liegt bei mindestens 70%. Zusätzlich ist die Expressionsanalyse von AR (Androgenrezeptors) möglich.

Die Anreicherung von zirkulierenden Tumorzellen aus peripherem Blut erfolgt unter Verwendung des *AdnaTest ProstateCancerSelect*.

## Abkürzungen und Symbole

|                                                                                     |                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| <i>AdnaMag-S</i>                                                                    | Magnetpartikelkonzentrator (klein, "-small") |
| AR                                                                                  | Androgenrezeptor                             |
| bp                                                                                  | Basenpaare                                   |
| cDNA                                                                                | Komplementäre Desoxyribonukleinsäure         |
| C+                                                                                  | Positivkontrolle                             |
| C-                                                                                  | Negativkontrolle                             |
| DNA                                                                                 | Desoxyribonukleinsäure                       |
| dNTPs                                                                               | Desoxyribonukleosidtriphosphate              |
| EGFR                                                                                | Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor         |
| mRNA                                                                                | Boten-Ribonukleinsäure                       |
| PCR                                                                                 | Polymerase-Kettenreaktion                    |
| PSA                                                                                 | Prostata-spezifisches Antigen                |
| PSMA                                                                                | Prostata-spezifisches Membranantigen         |
| RNase                                                                               | Ribonuklease                                 |
| rpm                                                                                 | Umdrehungen pro Minute                       |
| RT                                                                                  | Reverse Transkription                        |
|  | Haltbarkeitsdatum                            |
|  | Lagerungstemperatur                          |
|  | Artikelnummer                                |
|  | Gebrauchsanweisung beachten                  |
|  | Hergestellt von                              |

## **Patente und eingetragene Markenzeichen**

Dieser Test erfordert Lizenzen der Firma Hoffmann-La Roche AG, Basel. Der Kauf eines *AdnaTests* berechtigt den Nutzer nicht, die PCR ohne Lizenz durchzuführen. *Dynabeads*<sup>®</sup> ist ein eingetragenes Markenzeichen der Firmen Invitrogen und Life Technologies Corporation. Die Warenzeichen *Sensiscript* und *HotStarTaq* wurden von der Firma QIAGEN, Hilden, eingetragen. *LabChip* ist ein eingetragenes Warenzeichen der Caliper Technologies Corp., Kalifornien, US.

## Produktbeschreibung

Der *AdnaTest ProstateCancerDetect* enthält Oligo (dT)<sub>25</sub>-gekoppelte Magnetpartikel zur Isolierung von mRNA aus Lysaten angereicherter Tumorzellen. Unter Verwendung der durch reverse Transkription gewonnenen cDNA erfolgen der Nachweis und die Charakterisierung der Tumorzellen mittels Multiplex-PCR. Mit dem *PrimerMix ProstateDetect* können drei Prostatakrebs-assoziierte Gene sowie ein Kontroll-Gen untersucht werden. Mit dem *PrimerMix AR-Detect* kann der Androgenrezeptor untersucht werden. Die Primer erzeugen Fragmente der folgenden Größen:

### Primermix ProstateDetect:

|        |                                |
|--------|--------------------------------|
| PSMA:  | 449 bp                         |
| PSA:   | 357 bp                         |
| EGFR:  | 163 bp                         |
| Aktin: | 120 bp (interne PCR-Kontrolle) |

### Primermix AR- Detect:

|     |        |
|-----|--------|
| AR: | 440 bp |
|-----|--------|

**Hinweis:** Die Größe der Fragmente kann leicht variieren. Bitte verwenden Sie die *Positivkontrollen (C+)* 9 und 11 für die Zuordnung der Signale.

## Kit-Bestandteile

Der *AdnaTest ProstateCancerDetect* enthält die folgenden Komponenten:

**Tabelle 1: Kit-Bestandteile**

| Komponente                              | Symbol | T-1-521<br>(12 Tests) |
|-----------------------------------------|--------|-----------------------|
| <i>Lysis/Binding Buffer</i>             | 3      | 1                     |
| <i>Dynabeads Oligo(dT)<sub>25</sub></i> | 4      | 1                     |
| <i>Buffer A</i>                         | 5      | 1                     |
| <i>Buffer B</i>                         | 6      | 1                     |
| <i>10 mM Tris-HCl</i>                   | 7      | 1                     |
| <i>PrimerMix ProstateDetect</i>         | 8      | 1                     |
| <i>Positive Control (C+)</i>            | 9      | 1                     |
| <i>PrimerMix AR-Detect</i>              | 10     | 1                     |
| <i>Positive Control AR (C+)</i>         | 11     | 1                     |

Die Reagenzien reichen für die Analyse von 6 PCR Kontrollen und 12 Blutproben.

## Vom Anwender bereitzustellen

### Geräte:

- Überkopfmischer für 1.5 ml Gefäße
- Magnetpartikelkonzentrator *AdnaMag-S* (QIAGEN Hannover GmbH, Artikel-Nr. T-1-800)
- Thermoblock oder Wasserbad (65 °C)
- Thermocycler mit heizbarem Deckel und einer Heizrate von 2 °C/s.
- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) oder ein alternatives System.

### Verbrauchsmaterialien:

- Sterile, RNase-freie dünnwandige 0.2 ml PCR-Gefäße
- Sterile, RNase-freie 1.5 ml Reaktionsgefäße (z. B. Sarstedt, Artikel-Nr. 72.690)
- Pipetten und RNase-freie Pipettenspitzen mit Filter als Aerosolbarriere zum Pipettieren von Volumina zwischen 1 µl und 200 µl
- Schutzhandschuhe



## Reagenzien:

- *Sensiscript* Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Artikel-Nr. 205211, 50 Reaktionen)
- Rekombinantes RNAsin, RNase-Inhibitor, 2.500 U (Promega, Artikel-Nr. N2511)
- *HotStarTaq Master Mix* Kit (QIAGEN, Artikel-Nr. 203443, 250 U)

## **Lagerung**

Der *AdnaTest ProstateCancerDetect* wird bei +4 °C gelagert und darf nur bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. **Lagern Sie die Boxen mit dem *PrimerMixer* und die *Positiv Kontrollen* separat bei -20 °C.** Um Kontaminationen und wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden, empfehlen wir, den Primermix zu aliquotieren.

## Besondere Anwendungshinweise

- Der Test darf nur von Fachpersonal durchgeführt werden, das molekularbiologische Techniken beherrscht.
- Alle Kitkomponenten und weitere zugekaufte Reagenzien sind laut Herstellerangaben zu lagern. Es gelten die Sicherheitshinweise des jeweiligen Herstellers.
- Zur Vermeidung von DNA-, RNA- und RNase-Kontaminationen sind Schutzhandschuhe zu tragen.



Alle Arbeitsschritte müssen entsprechend des Protokolls durchgeführt werden. Dabei sind u. a. die Reihenfolge der Arbeitsschritte, Inkubationszeiten und -temperaturen einzuhalten.

- Es wird dringend empfohlen, die Probenbearbeitung inkl. der reversen Transkription möglichst räumlich getrennt von der Analyse der PCR-Produkte durchzuführen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- **Die Verwendung von Produkten anderer, nicht genannter Hersteller kann zur Verschlechterung der Ergebnisse führen.**
- Die Hygiene- und Sicherheitsvorschriften des Laborbetriebes sind einzuhalten (z. B.: das Tragen von Laborkittel, Schutzbrille, Schutzhandschuhen).

## Protokoll

Die Abschnitte A bis C beinhalten die mRNA-Isolierung und die Reverse Transkription, die Abschnitte D bis F beschreiben die Multiplex-PCR sowie die Fragment Analyse.

### A. Vorbereitung der *Dynabeads Oligo(dT)<sub>25</sub>*

1. *Lysis/Binding Buffer* 3 auf Raumtemperatur erwärmen.

**Hinweis:** Prüfen Sie den *Lysis/Binding Buffer* hinsichtlich möglicher Präzipitate. Sollten sich während der Lagerung Präzipitate gebildet haben, bringen Sie diese durch Mischen des auf Raumtemperatur erwärmten Puffers vollständig in Lösung.

2. *Dynabeads Oligo(dT)<sub>25</sub>* 4 mit einer Pipette sorgfältig resuspendieren; nicht vortexen!
3. Benötigtes Volumen an Beads entsprechend der Probenzahl berechnen (20 µl je Probe zuzüglich 10 %) und in ein RNase-freies 1.5 ml Reaktionsgefäß überführen.
4. Reaktionsgefäß in den *AdnaMag-S* stellen.

**Hinweis:** Der Magnetschieber des *AdnaMag-S* kann in zwei unterschiedlichen Positionen eingesetzt werden. Setzen Sie den Magnetschieber immer mit nach vorn gerichteter weißer Kunststoffolie ein, damit sich die Magnete möglichst nah an den Reaktionsgefäßen befinden.

5. Nach 1 min den Überstand mit einer Pipette entfernen.

6. Waschschritte
  - a. Magnetschieber aus dem *AdnaMag-S* herausnehmen.
  - b. Die Beads mit dem ursprünglichen Volumen (Schritt 3) *Lysis/Binding Buffer* [3] durch mehrmaliges Pipettieren vorsichtig resuspendieren, um Schaumbildung zu vermeiden.
  - c. Magnetschieber in den *AdnaMag-S* einsetzen.
  - d. Nach 1 min den Überstand vollständig entfernen.**Einmal wiederholen (insgesamt 2 Waschschritte).**
7. Das Reaktionsgefäß aus dem *AdnaMag-S* nehmen und die Beads mit dem ursprünglichen Volumen *Lysis/Binding Buffer* [3] resuspendieren (siehe Schritt 3).

## **B. mRNA Isolation**

### Vorbereitung:

1. Waschpuffer *Buffer A* [5] und Waschpuffer *Buffer B* [6] auf Raumtemperatur erwärmen.
2. *10 mM Tris-HCl* [7] auf Eis stellen.
3. RNase-freies Wasser auftauen (Bestandteil des *Sensiscript* Reverse Transcriptase-Kit, QIAGEN).
4. Thermoblock oder Wasserbad auf 65 °C vorheizen.

### Durchführung:

1. Je 20 µl *Dynabeads Oligo(dT)<sub>25</sub>* (Schritt A7) in jedes Zellysat enthaltende Reaktionsgefäß (*AdnaTest ProstateCancerSelect* Gebrauchsanweisung, Schritt B16) pipettieren.
2. Die Röhrchen für 10 min bei Raumtemperatur in einem Überkopfmischer, der Drehen mit Neigung ermöglicht, langsam drehen lassen (~5 rpm).
3. Reaktionsgefäße in den *AdnaMag-S* ohne Magnetschieber stellen. Durch Abwärtsschwingen des *AdnaMag-S* die am Deckel der Gefäße hängenden Beads und Tropfen ablösen.
4. Magnetschieber in den *AdnaMag-S* einsetzen und nach 1 min den Überstand mit einer Pipette entfernen.
5. Waschschrift A
  - a. Magnetschieber aus dem *AdnaMag-S* herausnehmen.
  - b. 100 µl Waschpuffer *Buffer A* 5 in jedes Reaktionsgefäß geben und durch mehrmaliges Pipettieren resuspendieren. Den Gefäßdeckel und die Gefäßwand dabei gründlich spülen, um einen Verlust an Beads zu verhindern.
  - c. Magnetschieber in den *AdnaMag-S* einsetzen.
  - d. Nach 1 min den Überstand vollständig entfernen.**Einmal wiederholen (insgesamt 2 Waschschrritte).**
6. Waschschrift B
  - a. Magnetschieber aus dem *AdnaMag-S* herausnehmen.
  - b. 100 µl Waschpuffer *Buffer B* 6 in jedes Reaktionsgefäß geben, durch mehrmaliges Pipettieren resuspendieren und in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführen.
  - c. Magnetschieber in den *AdnaMag-S* einsetzen.

d. Nach 1 min den Überstand vollständig entfernen. Es ist darauf zu achten, dass die Beads beim eventuellen Abrutschen von der Gefäßwand nicht versehentlich mit entfernt werden.

**Einmal in demselben Reaktionsgefäß wiederholen (insgesamt 2 Waschschrirte).**

7. Magnetschieber aus dem *AdnaMag-S* herausnehmen.
8. 100 µl eiskaltes 10 mM Tris-HCl 7 in jedes Reaktionsgefäß geben und durch mehrmaliges Pipettieren resuspendieren.
9. Magnetschieber in den *AdnaMag-S* einsetzen.
10. Nach 1 min den Überstand vollständig entfernen.
11. Magnetschieber aus dem *AdnaMag-S* herausnehmen.
12. Den mRNA/Bead-Komplex in 14.75 µl RNase-freiem Wasser resuspendieren.
13. Die Reaktionsgefäße in einen Thermoblock oder in ein Wasserbad stellen und für 5 min bei 65 °C inkubieren.
14. Reaktionsgefäße sofort für mindestens 2 min auf Eis stellen.
15. Umgehend (innerhalb von 5 min) mit der reversen Transkription fortfahren (Abschnitt C).

**Eine Lagerung des mRNA/Dynabeads-Komplexes  
ist nicht möglich!**

### **C. Reverse Transkription**

(*Sensiscript* Reverse Transcriptase Kit, QIAGEN)

1. Den 10 x Buffer RT und die dNTPs bei Raumtemperatur auftauen lassen, vortexen, kurz zentrifugieren und auf Eis stellen. Der RT Master Mix sollte ebenfalls auf Eis gehalten werden.

- Die Herstellung des RT Master Mix für die entsprechende Anzahl an Proben erfolgt gemäß Tabelle 2.

Das Volumen des Master Mix sollte 10 % größer als die für alle RT-Reaktionsansätze berechnete Menge sein. Ein Ansatz ohne Zugabe von mRNA dient als Negativkontrolle (RT-Kontrolle).

- Den RT Master Mix gründlich vortexen, kurz zentrifugieren und 5.25 µl pro Ansatz in ein 0.2 ml PCR-Reaktionsgefäß pipettieren.
- Den mRNA/Dynabeads-Komplex (Schritt B14) vorsichtig mit einer Pipette resuspendieren und das gesamte Volumen in ein 0.2 ml PCR-Reaktionsgefäß mit vorgelegtem RT Master Mix geben. Durch wiederholtes Pipettieren sorgfältig mischen.

**Tabelle 2: Reverse Transkription**

| Komponenten          |                                                                               |                                                | Volumen |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|---------|
| <b>RT Master Mix</b> | <i>Sensiscript</i> Reverse Transcriptase Kit (QIAGEN)                         | 10x Buffer RT                                  | 2.0 µl  |
|                      |                                                                               | dNTPs                                          | 2.0 µl  |
|                      |                                                                               | <i>Sensiscript Reverse Transcriptase (SRT)</i> | 1.0 µl  |
|                      | RNase Inhibitor, 40 U/µl (Promega)                                            |                                                | 0.25 µl |
| <b>Proben</b>        | mRNA/Bead-Komplex oder RT-Kontrolle (RNase-freies Wasser) je <sup>(1)</sup> : | 14.75 µl                                       |         |
| <b>Gesamtvolumen</b> |                                                                               |                                                | 20.0 µl |

- <sup>1)</sup> **Hinweis:** Als RT-Kontrolle geben Sie 14.75 µl RNase-freies Wasser anstelle des mRNA/Bead-Komplexes hinzu. Das Volumen des mRNA/Bead-Komplexes kann leicht variieren. Verwenden Sie in jedem Fall das gesamte Volumen für die reverse Transkription!

5. Die cDNA-Synthese erfolgt im Thermocycler unter folgenden Bedingungen (Tabelle 3).

**Tabelle 3: RT-Programm**

|       |        |
|-------|--------|
| 37 °C | 60 min |
| 93 °C | 5 min  |
| 4 °C  | ∞      |

6. Die Reaktionsgefäße mit der cDNA umgehend auf Eis stellen oder für max. 4 Wochen bei -20 °C lagern.

#### **D. Multiplex-PCR (Prostate)**

1. Den *HotStarTaq Master Mix* (QIAGEN), RNase-freies Wasser, *PrimerMix ProstateDetect* [8] und *Positive Control (C+)* [9] auftauen, vortexen, kurz zentrifugieren und auf Eis stellen.
2. Die Herstellung des PCR Master Mix für die entsprechende Anzahl an Proben erfolgt gemäß Tabelle 4.  
  
Das Volumen des Master Mix sollte 10 % größer als die für alle Reaktionsansätze berechnete Menge sein. Es müssen stets eine *Positive Control (C+)* [9], RNase-freies Wasser als Negativkontrolle (C-) und die RT-Kontrolle mitgeführt werden.
3. Pro Ansatz 21.0 µl des Master Mix in ein 0.2 ml PCR-Reaktionsgefäß pipettieren, den cDNA/Bead-Komplex durch Pipettieren gründlich mischen und 4.0 µl in das Reaktionsgefäß mit dem Master Mix geben.

**Hinweis:** Als Negativkontrolle geben Sie 4.0 µl RNase-freies Wasser anstelle von cDNA hinzu.



**Tabelle 4: Vorbereitung der Multiplex-PCR**

| Komponenten           |                                                                                                                       | Volumen |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| <b>PCR Master Mix</b> | HotStarTaq Master Mix                                                                                                 | 12.5 µl |
|                       | RNase-freies Wasser                                                                                                   | 4.5 µl  |
|                       | <i>PrimerMix ProstateDetect</i> [8]                                                                                   | 4.0 µl  |
| <b>Proben</b>         | cDNA oder<br>RT-Kontrolle oder<br>Negativkontrolle (RNase-freies Wasser) oder<br><i>Positive Control (C+)</i> [9] je: | 4.0 µl  |
| <b>Gesamtvolumen</b>  |                                                                                                                       | 25.0 µl |

Die PCR erfolgt in einem Thermocycler gemäß des in Tabelle 5 beschriebenen Programms mit insgesamt 42 Zyklen. Die Heizrate des Thermocyclers ist auf 2 °C/Sekunde einzustellen.

**Tabelle 5: PCR-Programm**

|       |       |             |
|-------|-------|-------------|
| 95 °C | 15min | ] 42 Zyklen |
| 94 °C | 30sec |             |
| 61 °C | 30sec |             |
| 72 °C | 30sec |             |
| 72 °C | 10min |             |
| 4 °C  | ∞     |             |

## E. Singleplex-PCR (AR-Detect)

1. Den *HotStarTaq Master Mix* (QIAGEN), RNase-freies Wasser, *PrimerMix AR-Detect* [10] und *Positive Control (C+)* [11] auftauen, vortexen, kurz zentrifugieren und auf Eis stellen.
2. Die Herstellung des PCR Master Mix für die entsprechende Anzahl an Proben erfolgt gemäß Tabelle 4.

Das Volumen des Master Mix sollte 10 % größer als die für alle Reaktionsansätze berechnete Menge sein. Es müssen stets eine *Positive Control (C+)* [11], RNase-freies Wasser als Negativkontrolle (C-) und die RT-Kontrolle mitgeführt werden.

3. Pro Ansatz 21.0 µl des Master Mix in ein 0.2 ml PCR-Reaktionsgefäß pipettieren, den cDNA/Bead-Komplex durch Pipettieren gründlich mischen und 4.0 µl in das Reaktionsgefäß mit dem Master Mix geben.

**Hinweis:** Als Negativkontrolle geben Sie 4.0 µl RNase-freies Wasser anstelle von cDNA hinzu.

**Tabelle 6: Vorbereitung der Singleplex-PCR**

| Komponenten           |                                                                                                                        | Volumen |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| <b>PCR Master Mix</b> | HotStarTaq Master Mix                                                                                                  | 12.5 µl |
|                       | RNase-freies Wasser                                                                                                    | 4.5 µl  |
|                       | <i>PrimerMix AR-Detect</i> [10]                                                                                        | 4.0 µl  |
| <b>Proben</b>         | cDNA oder<br>RT-Kontrolle oder<br>Negativkontrolle (RNase-freies Wasser) oder<br><i>Positive Control (C+)</i> [11] je: | 4.0 µl  |
| <b>Gesamtvolumen</b>  |                                                                                                                        | 25.0 µl |

Die PCR erfolgt in einem Thermocycler gemäß des in Tabelle 5 beschriebenen Programms mit insgesamt 35 Zyklen. Die Heizrate des Thermocyclers ist auf 2 °C/Sekunde einzustellen.

**Tabelle 7: PCR-Programm**

|       |       |             |
|-------|-------|-------------|
| 95 °C | 15min | } 35 Zyklen |
| 94 °C | 30sec |             |
| 60 °C | 30sec |             |
| 72 °C | 60sec |             |
| 72 °C | 10min |             |
| 4 °C  | ∞     |             |

## **F. Fragmentanalyse**

### **Agilent 2100 Bioanalyser**

Empfohlen wird, die PCR-Produkte mit dem Agilent 2100 Bioanalyser und dem DNA 1000 LabChip (Agilent Technologies) zu analysieren. Befolgen Sie die Gebrauchsanweisung des DNA 1000 LabChip und stellen Sie sicher, dass keine Magnetpartikel in den Chip gelangen. Im Gel befindliche Magnetpartikel können fehlerhafte Ergebnisse erzeugen.

Starten Sie die Bioanalyser Software "2100 expert". In der Spalte "Contexts" wählen Sie "Instrument" und klicken Sie auf die Schaltfläche "Assay" neben "Assay selection". Wählen Sie "electrophoresis > DNA 1000 Series II.xsy". Bereiten Sie den Chip vor und starten Sie die Analyse. Für die korrekte Auswertung der Ergebnisse muss die Detektionsgrenze wie folgt eingestellt werden:

In der Spalte "Contexts" wählen Sie "Data" und anschließend den Reiter "Assay Properties". Auf der rechten Seite "Global" und "Normal" im Pulldown-Menü auswählen. Unter "Sample Setpoints > Integrator > height threshold (FU)" den Wert auf "0" setzen (Vorgegebener Standardwert "20"), um alle Signale zu erfassen.

### **Auswertung (Prostate Detect)**

Der Test wird positiv gewertet, wenn das PCR-Fragment mindestens eines Tumor-assoziierten Markers eindeutig nachweisbar ist.

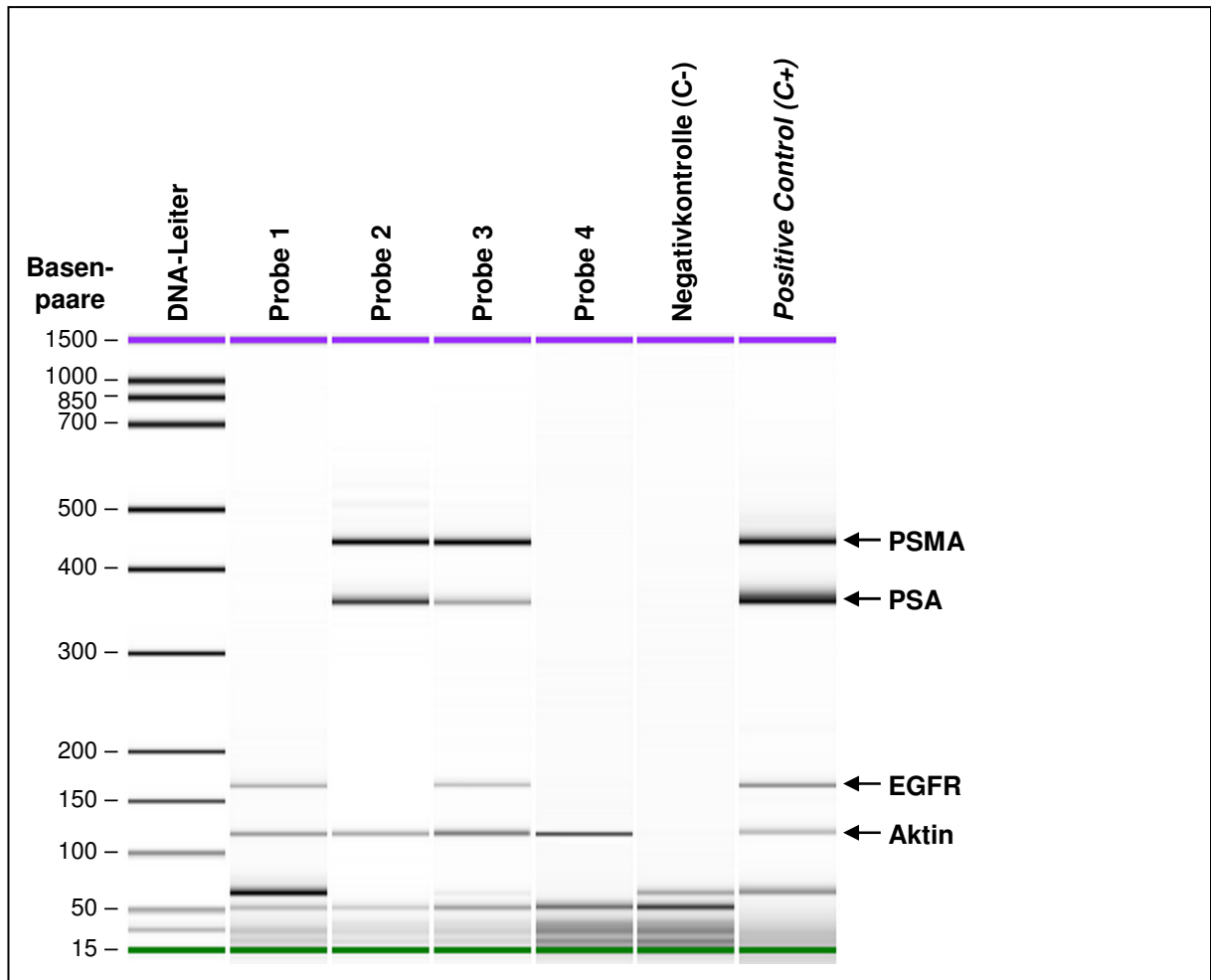
Peaks mit einer Konzentration von  $\geq 0.10$  ng/ $\mu$ l sind positiv zu bewerten (Abb. 1).

Das Fragment des Kontroll-Gens Aktin muss in allen Patientenproben nachweisbar sein (interne PCR-Kontrolle). Ein Aktin-Signal stellt eine Positivkontrolle für die erfolgreiche Zellanreicherung, die reverse Transkription und die Multiplex-PCR dar. Negativkontrolle und RT-Kontrolle dürfen keine Banden enthalten, die größer sind als 80 Basenpaare (Primerdimere).

Die Detektion von Fragmenten mit einer Größe von mehr als 900 bp deutet auf eine Kontamination mit genomischer DNA hin. Der Separationsprozess war somit nicht erfolgreich und die Ergebnisse müssen verworfen werden.

**Jede Abweichung vom Protokoll kann zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen führen.**

Wenn Sie Unterstützung bei der Interpretation von Ergebnissen benötigen, hilft Ihnen unser Team gerne weiter.



**Abb. 1: AdnaTest ProstateCancerDetect Ergebnisse nach Analyse durch einen Agilent 2100 Bioanalyser**

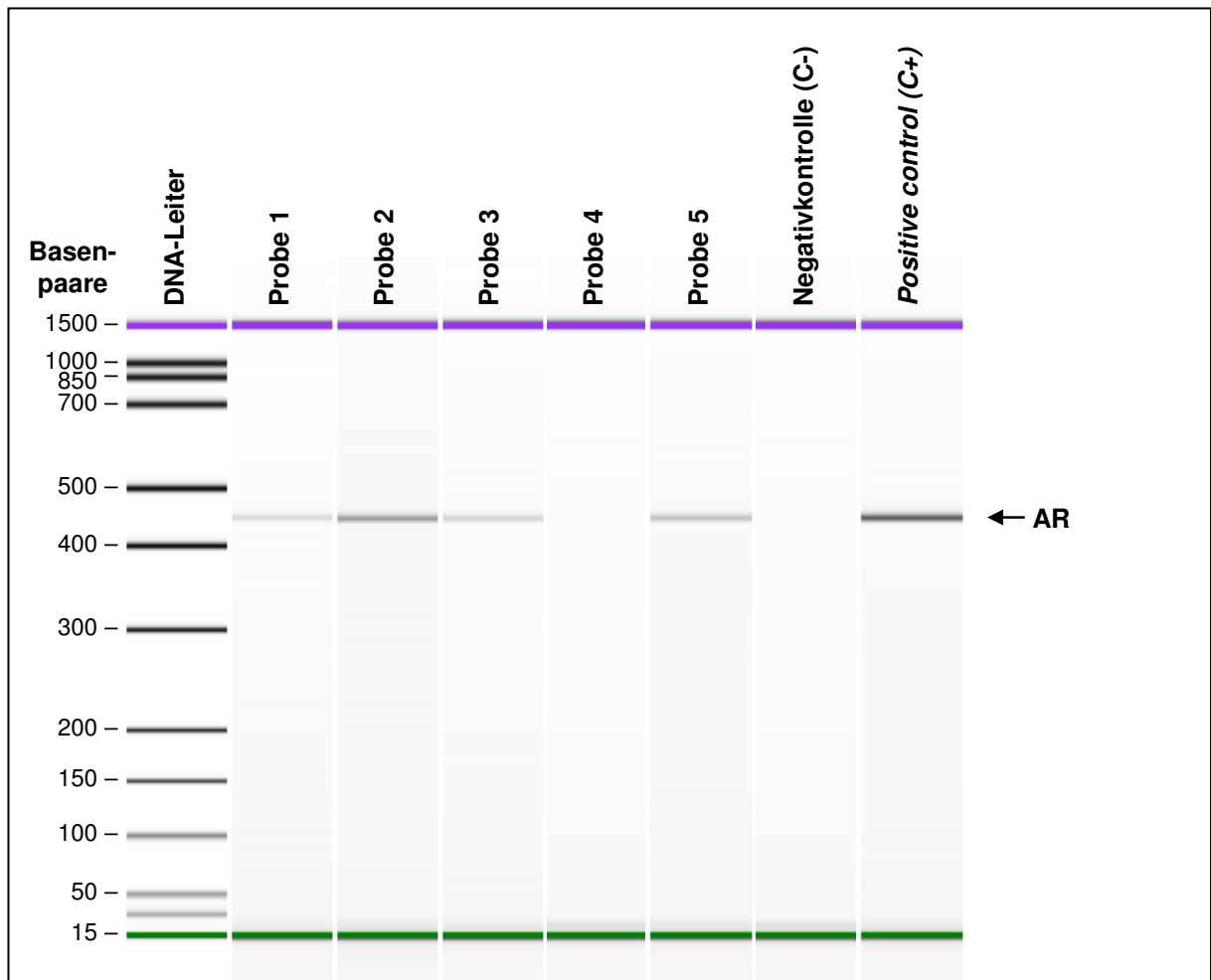
Die erste Spur enthält den DNA-Größenstandard (DNA-Leiter). Probe 1 ist positiv für EGFR, Probe 2 ist positiv für PSMA und PSA und Probe 3 ist positiv PSMA, PSA und EGFR. Probe 4 ist negativ. Aktin ist in den Proben 1 bis 4 nachweisbar. Die beiden letzten Spuren enthalten die PCR Negativkontrolle (C-) und die *Positive Control* (C+).

## **Auswertung (AR-Detect)**

Peaks mit einer Konzentration von  $\geq 0.15$  ng/ $\mu$ l für AR sind positiv. Negativkontrolle und RT-Kontrolle dürfen keine Banden enthalten, die größer sind als 80 Basenpaare (Primerdimere).

**Jede Abweichung vom Protokoll kann zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen führen.**

Wenn Sie Unterstützung bei der Interpretation von Ergebnissen benötigen, hilft Ihnen unser Team gerne weiter.



**Abb. 3: AdnaTest AR-Detect Ergebnisse nach Analyse durch einen Agilent 2100 Bioanalyzer**

Die erste Spur enthält den DNA-Größenstandard (DNA-Leiter). Proben 1 bis 3 sowie Probe 5 sind positiv für AR. Probe 4 ist negativ. Die beiden letzten Spuren enthalten die PCR Negativkontrolle (C-) und die *Positive Control* (C+).



## Literatur

Literaturhinweise finden Sie auf unserer Web-Seite

<http://www.adnagen.com>

## Fehlerbehebung

Das Misslingen der Genexpressionsanalyse kann verschiedene Ursachen haben. Grundsätzlich gilt, dass sämtliche Arbeitsschritte immer entsprechend der Angaben im Handbuch durchgeführt werden müssen. Sollten dennoch Probleme auftreten, gehen Sie auf [www.adnagen.com](http://www.adnagen.com) und laden Sie sich im Produktbereich die Anleitung zur Fehlerbehebung herunter. Dort finden Sie praktische Hinweise zur Durchführung des Tests und für die korrekte Interpretation der Ergebnisse.

Führen diese Hinweise nicht zur Beseitigung des Problems, so wenden Sie sich bitte an unser Team.

## Kurzanleitung

### *AdnaTest ProstateCancerDetect*

|                     |                                      |                                                                |
|---------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| <b>Bestandteile</b> | <i>Lysis/Binding Buffer</i>          | <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">3</span>  |
|                     | <i>Oligo (dT)<sub>25</sub> Beads</i> | <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">4</span>  |
|                     | <i>Buffer A</i>                      | <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">5</span>  |
|                     | <i>Buffer B</i>                      | <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">6</span>  |
|                     | <i>10 mM Tris-HCl</i>                | <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">7</span>  |
|                     | <i>PrimerMix ProstateDetect</i>      | <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">8</span>  |
|                     | <i>Positive Control (C+)</i>         | <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">9</span>  |
|                     | <i>PrimerMix AR-Detect</i>           | <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">10</span> |
|                     | <i>Positive Control (C+)</i>         | <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">11</span> |

- Sie benötigen**
- 0.2 ml PCR-Gefäße
  - 1x 1.5 ml Reaktionsgefäß je Probe
  - Pipetten und Pipettenspitzen (RNase-frei) für 1 - 200 µl
  - *Sensiscript* RT Kit (QIAGEN)
  - *HotStarTaq Master Mix* Kit (QIAGEN)

### Protokoll

- Die Reagenzien 3, 5 und 6 auf Raumtemperatur erwärmen und 7 auf Eis stellen.
- Für jede Probe je 20 µl *Oligo(dT)<sub>25</sub> Beads* 4 mit 2x 20 µl *Lysis/Binding Buffer* 3 waschen.
- Je 20 µl gewaschene *Oligo(dT)<sub>25</sub> Beads* 4 in jedes Zelllysate pipettieren.
- 10 min bei Raumtemperatur in einem Überkopfmischer (Drehen mit Neigung) langsam drehen lassen (~5 rpm).
- Reaktionsgefäße in den *AdnaMag-S* stellen und Überstand entfernen.

- Beads mit 2x 100 µl *Buffer A* [5] waschen.

**Achtung:** Gefäßdeckel und Gefäßwand gründlich spülen, um einen Verlust an Beads zu verhindern.

- Beads in 100 µl *Buffer B* [6] resuspendieren und in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführen.
- Beads mit 1x 100 µl *Buffer B* [6] waschen.
- Beads mit 1x 100 µl *Tris-HCl* [7] waschen.
- Resuspendieren der Beads in 29.5 µl RNase-freiem Wasser.
- Für 5 min bei 65 °C inkubieren, dann für mindestens 2 min auf Eis stellen.
- Umgehend mit reverser Transkription fortfahren; siehe Tabelle 8 und Tabelle 9.

**Tabelle 8: Reverse Transkription**

| Komponenten          |                                                                               |                                                | Volumen |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|---------|
| <b>RT Master Mix</b> | <i>Sensiscript</i> Reverse Transcriptase Kit (QIAGEN)                         | 10x Buffer RT                                  | 2.0 µl  |
|                      |                                                                               | dNTPs                                          | 2.0 µl  |
|                      |                                                                               | <i>Sensiscript Reverse Transcriptase (SRT)</i> | 1.0 µl  |
|                      | RNase Inhibitor, 40 U/µl (Promega)                                            |                                                | 0.25 µl |
| <b>Proben</b>        | mRNA/Bead-Komplex oder RT-Kontrolle (RNase-freies Wasser) je <sup>(1)</sup> : | 14.75 µl                                       |         |
| <b>Gesamtvolumen</b> |                                                                               |                                                | 20.0 µl |

<sup>1)</sup> **Hinweis:** Als RT-Kontrolle geben Sie 14.75 µl RNase-freies Wasser anstelle des mRNA/Bead-Komplexes hinzu. Das Volumen des mRNA/Bead-Komplexes kann leicht variieren. Verwenden Sie in jedem Fall das gesamte Volumen für die reverse Transkription!

**Tabelle 9: RT-Programm**

|       |        |
|-------|--------|
| 37 °C | 60 min |
| 93 °C | 5 min  |
| 4 °C  | ∞      |

Fahren Sie fort mit:

- Multiplex-PCR, Tabellen 10 und 11  
→ *Prostate Detect*
- Singelplex-PCR, Tabellen 12 und 13  
→ *AR- Detect*

oder lagern Sie die cDNA für max. 4 Wochen bei -20 °C.

**Tabelle 10: Vorbereitung der Multiplex-PCR**

| Komponenten           |                                                                                                                       | Volumen |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| <b>PCR Master Mix</b> | HotStarTaq Master Mix                                                                                                 | 12.5 µl |
|                       | RNase-freies Wasser                                                                                                   | 4.5 µl  |
|                       | <i>PrimerMix ProstateDetect</i> [8]                                                                                   | 4.0 µl  |
| <b>Proben</b>         | cDNA oder<br>RT-Kontrolle oder<br>Negativkontrolle (RNase-freies Wasser) oder<br><i>Positive Control (C+)</i> [9] je: | 4.0 µl  |
| <b>Gesamtvolumen</b>  |                                                                                                                       | 25.0 µl |

- Die PCR wird mit insgesamt 42 Zyklen durchgeführt.

**Tabelle 11: PCR-Programm**

|       |       |             |
|-------|-------|-------------|
| 95 °C | 15min | ] 42 Zyklen |
| 94 °C | 30sec |             |
| 61 °C | 30sec |             |
| 72 °C | 30sec |             |
| 72 °C | 10min |             |
| 4 °C  | ∞     |             |

**Tabelle12: Singleplex-PCR**

| Komponenten           |                                                                                                                       | Volumen |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| <b>PCR Master Mix</b> | <i>HotStarTaq Master Mix</i>                                                                                          | 12.5 µl |
|                       | RNase-freies Wasser                                                                                                   | 4.5 µl  |
|                       | <i>PrimerMix AR-Detect</i> [8]                                                                                        | 4.0 µl  |
| <b>Proben</b>         | cDNA oder<br>RT-Kontrolle oder<br>Negativkontrolle (RNase-freies Wasser) oder<br><i>Positive Control (C+)</i> [9] je: | 4.0 µl  |
| <b>Gesamtvolumen</b>  |                                                                                                                       | 25.0 µl |

- Die PCR wird mit insgesamt 35 Zyklen durchgeführt.

**Tabelle 13: PCR-Programm**

|       |       |             |
|-------|-------|-------------|
| 95 °C | 15min | } 35 Zyklen |
| 94 °C | 30sec |             |
| 60 °C | 30sec |             |
| 72 °C | 60sec |             |
| 72 °C | 10min |             |
| 4 °C  | ∞     |             |

- Bitte verwenden Sie für die Fragmentanalyse einen Agilent 2100 Bioanalyser.





QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1  
D-40724 Hilden  
Deutschland

Bei Fragen kontaktieren Sie uns unter

Telefon: +49 (0) 511 72 59 50 - 50

Fax: +49 (0) 511 72 59 50 - 40

Email: [support@adnagen.com](mailto:support@adnagen.com)

Internet: [www.adnagen.com](http://www.adnagen.com)