

Version 150605 DE

# *AdnaTest* *EMT-2/StemCellDetect*

**RT-PCR Kit zur Analyse angereicherter Tumorzellen hinsichtlich der Expression von Markern, die mit der Epithelial-Mesenchymalen Transition und Tumorstammzellen assoziiert werden**

*Nur für Forschungszwecke*

## **Gebrauchsanweisung**

**REF** T-1-537

## Inhaltsverzeichnis

Bestellinformation .....	3
Anwendungszweck .....	3
Abkürzungen und Symbole.....	5
Patente und eingetragene Markenzeichen .....	6
Produktbeschreibung.....	7
Kit-Bestandteile.....	8
Vom Anwender bereitzustellen .....	9
Lagerung.....	10
Besondere Anwendungshinweise.....	11
Protokoll.....	12
A. Vorbereitung der Dynabeads Oligo(dT) <sub>25</sub> .....	12
B. mRNA Isolation.....	13
C. Reverse Transkription .....	15
D. Multiplex-PCR (EMT-2) .....	17
E. Singleplex-PCR (StemCell) .....	19
F. Fragmentanalyse .....	21
Literatur.....	26
Fehlerbehebung.....	26
Kurzanleitung.....	27

## 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)).

### Erhältliche Add-ons (12 Reaktionen):

Artikel Nr.	Tumor	Gene
T-1-537-PB	EMT-2 Add-on Breast	GA733-2, Her2, Muc-1
T-1-537-PC	EMT-2 Add-on Colon	GA733-2, CEA, EGFR
T-1-537-PP	EMT-2 Add-on Prostata	PSMA, PSA, EGFR
T-1-537-PO-2	EMT-2 Add-on Ovarian-2	CA125, GA733-2, Muc-1

## Anwendungszweck






Der *AdnaTest EMT-2/StemCellDetect* dient dem Nachweis von EMT- (Epithelial-Mesenchymale Transition) und Tumorstammzellmerkmalen in immunomagnetisch angereicherten Tumorzellen mittels reverser Transkription und PCR. Der Nachweis erfolgt dabei mit einer Spezifität von mindestens 90%. Für die EMT-2 Marker liegt die Wiederfindung von 20 Zellen in 5 ml Vollblut in Spiking-Experimenten bei mindestens 70%. Für die StemCell Marker liegt

die Wiederfindung von 10 Zellen in 5 ml Vollblut in Spiking-Experimenten ebenfalls bei mindestens 70%.

Der *AdnaTest EMT-2/StemCellDetect* ist ausschließlich für Forschungszwecke bestimmt.

Optional ist die Expressionsanalyse Tumor-assoziiierter Gene der Entitäten Brust, Colon, Prostata und Ovar möglich (siehe auch Bestellinformation, erhältliche Add-ons).

## Abkürzungen und Symbole

<i>AdnaMag-S</i>	Magnetpartikelkonzentrator (klein, "-small")
Akt-2	Proteinkinase B
ALDH1	Aldehyd Dehydrogenase 1
bp	Basenpaare
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C+	Positivkontrolle
C-	Negativkontrolle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI3K $\alpha$	Phosphoinositol-3-Kinase
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
TWIST1	Transkriptionsfaktor
	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 EMT-2/StemCellDetect* 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 Hilfe des *PrimerMix EMT-2* werden drei EMT-assoziierte Marker und ein Kontroll-Gen amplifiziert. Der *PrimerMix StemCell* amplifiziert ALDH1, welches als Marker für Tumorstammzellen beschrieben wird. Insgesamt erzeugen die zwei verschiedenen Primer-Mixe Fragmente der folgenden Größen:

### ***PrimerMix EMT-2***

PI3K $\alpha$ : 551 bp

Akt-2: 309 bp

TWIST1: 201 bp

Aktin: 120 bp (interne PCR-Kontrolle)

### ***PrimerMix StemCell***

ALDH1: 161 bp

**Hinweis:** Die Größe der Fragmente kann leicht variieren. Bitte verwenden Sie die *Positivkontrolle (C+)* 12 und 14 für die Zuordnung der Signale.

## Kit-Bestandteile

Der *AdnaTest EMT-2/StemCellDetect* enthält die folgenden Komponenten:

**Tabelle 1: Kit-Bestandteile**

Komponente	Symbol	T-1-537 (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 EMT-2</i>	11	1
<i>Positive Control EMT-2</i>	12	1
<i>PrimerMix StemCell</i>	13	1
<i>Positive Control StemCell</i>	14	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 (50 °C)
- Thermocycler mit heizbarem Deckel und einer Heizrate von 2 °C/s.
- Analysesystem wie z. B. der Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

### 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)

**Achtung:** Das *Sensiscript* Reverse Transcription Kit (Artikel-Nr. 205211) reicht nur für 25 Proben, da pro Reaktionsansatz das doppelte Volumen eingesetzt wird.

- Rekombinantes RNAsin, RNase-Inhibitor, 2.500 U (Promega, Artikel-Nr. N2511)
- *HotStarTaq Master Mix* Kit (QIAGEN, Artikel-Nr. 203443, 250 U)

## **Lagerung**

Der *AdnaTest EMT-2/StemCellDetect* wird bei +4 °C gelagert und darf nur bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

**Lagern Sie die Boxen mit den *PrimerMixen* und den *Positivkontrollen* separat bei -20 °C.** Um Kontaminationen und wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden, empfehlen wir, die Primermixe 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/Singleplex-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 50 °C vorheizen.

### Durchführung:

1. Je 20 µl *Dynabeads Oligo(dT)<sub>25</sub>* (Schritt A7) in jedes Zellysat enthaltende Reaktionsgefäß (*AdnaTest EMT-2/StemCellSelect* Gebrauchsanweisung, Schritt B20) 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 29.5 µl RNase-freiem Wasser resuspendieren.
13. Die Reaktionsgefäße in einen Thermoblock oder in ein Wasserbad stellen und für 5 min bei 50 °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 10.5 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	4.0 µl
		dNTPs	4.0 µl
		<i>Sensiscript Reverse Transcriptase (SRT)</i>	2.0 µl
	RNase Inhibitor, 40 U/µl (Promega)		0.5 µl
<b>Proben</b>	mRNA/Bead-Komplex oder RT-Kontrolle (RNase-freies Wasser) je <sup>(1)</sup> :	29.5 µl	
<b>Gesamtvolumen</b>			40.0 µl

- <sup>1)</sup> **Hinweis:** Als RT-Kontrolle geben Sie 29.5 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!



- 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	∞

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

#### **D. Multiplex-PCR (EMT-2)**

- Den *HotStarTaq Master Mix* (QIAGEN), RNase-freies Wasser, *PrimerMix EMT-2* [11] und *Positive Control EMT-2* [12] auftauen, vortexen, kurz zentrifugieren und auf Eis stellen.
- 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 EMT-2* [12], RNase-freies Wasser als Negativkontrolle (C-) und die RT-Kontrolle mitgeführt werden.

- Pro Ansatz 21.0 µl des Master Mix in ein 0.2 ml PCR-Reaktionsgefäß pipettieren, den cDNA/Bead-Komplex (Schritt C6) 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 (EMT-2)**

Komponenten		Volumen
<b>PCR Master Mix</b>	HotStarTaq Master Mix	12.5 µl
	RNase-freies Wasser	4.5 µl
	<i>PrimerMix EMT-2</i> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">11</span>	4.0 µl
<b>Proben</b>	cDNA oder RT-Kontrolle oder Negativkontrolle (RNase-freies Wasser) oder <i>Positive Control EMT-2</i> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">12</span> 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 5: PCR-Programm (EMT-2)**

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

## E. Singleplex-PCR (StemCell)

1. Den *HotStarTaq Master Mix* (QIAGEN), RNase-freies Wasser, *PrimerMix StemCell* [13] und *Positive Control StemCell* [14] auftauen, vortexen, kurz zentrifugieren und auf Eis stellen.
2. Die Herstellung des PCR Master Mix für die entsprechende Anzahl an Proben erfolgt gemäß Tabelle 6.

Das Volumen des Master Mix sollte 10 % größer als die für alle Reaktionsansätze berechnete Menge sein. Es müssen stets eine *Positive Control StemCell* [14], 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 (Schritt C6) 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 (StemCell)**

Komponenten		Volumen
<b>PCR Master Mix</b>	HotStarTaq Master Mix	12.5 µl
	RNase-freies Wasser	4.5 µl
	<i>PrimerMix StemCell</i> [13]	4.0 µl
<b>Proben</b>	cDNA oder RT-Kontrolle oder Negativkontrolle (RNase-freies Wasser) oder <i>Positive Control StemCell</i> [14] je:	4.0 µl
<b>Gesamtvolumen</b>		25.0 µl

Die PCR erfolgt in einem Thermocycler gemäß des in Tabelle 7 beschriebenen Programms mit insgesamt 35 Zyklen. Die Heizrate des Thermocyclers ist auf 2 °C/Sekunde einzustellen.

**Tabelle 7: PCR-Programm (StemCell)**

95 °C	15 min	} 35 Zyklen
94 °C	30 sec	
51 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

**Hinweis:** Als Negativkontrolle geben Sie 8.0 µl RNase-freies Wasser anstelle von cDNA hinzu.

## F. Fragmentanalyse

### Agilent 2100 Bioanalyzer

Empfohlen wird, die PCR-Produkte mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer 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 Bioanalyzer 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 (EMT-2)**

Der Test wird positiv gewertet, wenn das PCR-Fragment mindestens eines EMT-assoziierten Markers (PI3K $\alpha$ , Akt-2 or TWIST1) eindeutig nachweisbar ist.

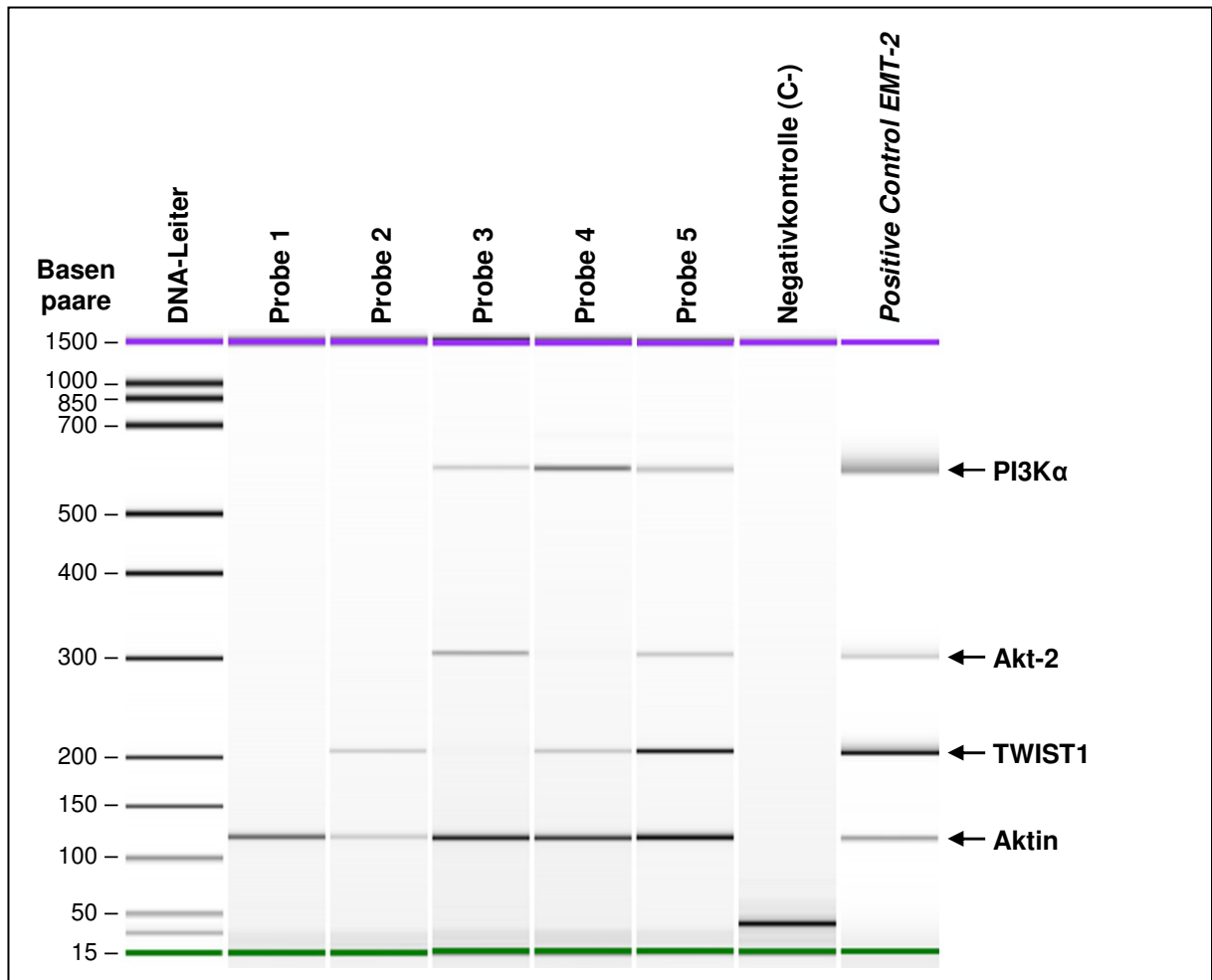
Bei Verwendung des Agilent 2100 Bioanalyzers sind Peaks mit einer Konzentration von  $\geq 0.25$  ng/ $\mu$ l positiv (Abb. 1).

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 1000 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 EMT-2/StemCellDetect Ergebnisse nach Analyse durch einen Agilent 2100 Bioanalyzer: EMT-2-assoziierte Genexpression**

Die erste Spur enthält den DNA-Größenstandard (DNA-Leiter). Probe 1 ist negativ. Probe 2 ist positiv für TWIST1, Probe 3 ist positiv für Akt-2 und PI3K $\alpha$  und Probe 4 ist positiv für PI3K $\alpha$  und TWIST1. Signale aller drei EMT-2 Marker können in Probe 5 detektiert werden und Aktin ist in den Proben 1 bis 5 nachweisbar. Die beiden letzten Spuren enthalten die PCR Negativkontrolle (C-) und die *Positive Control EMT-2*.

## **Auswertung (StemCell)**

Bei Verwendung des Agilent 2100 Bioanalyzers sind Peaks mit einer Konzentration von  $\geq 0.15$  ng/ $\mu$ l für ALDH1 positiv (Abb. 2).

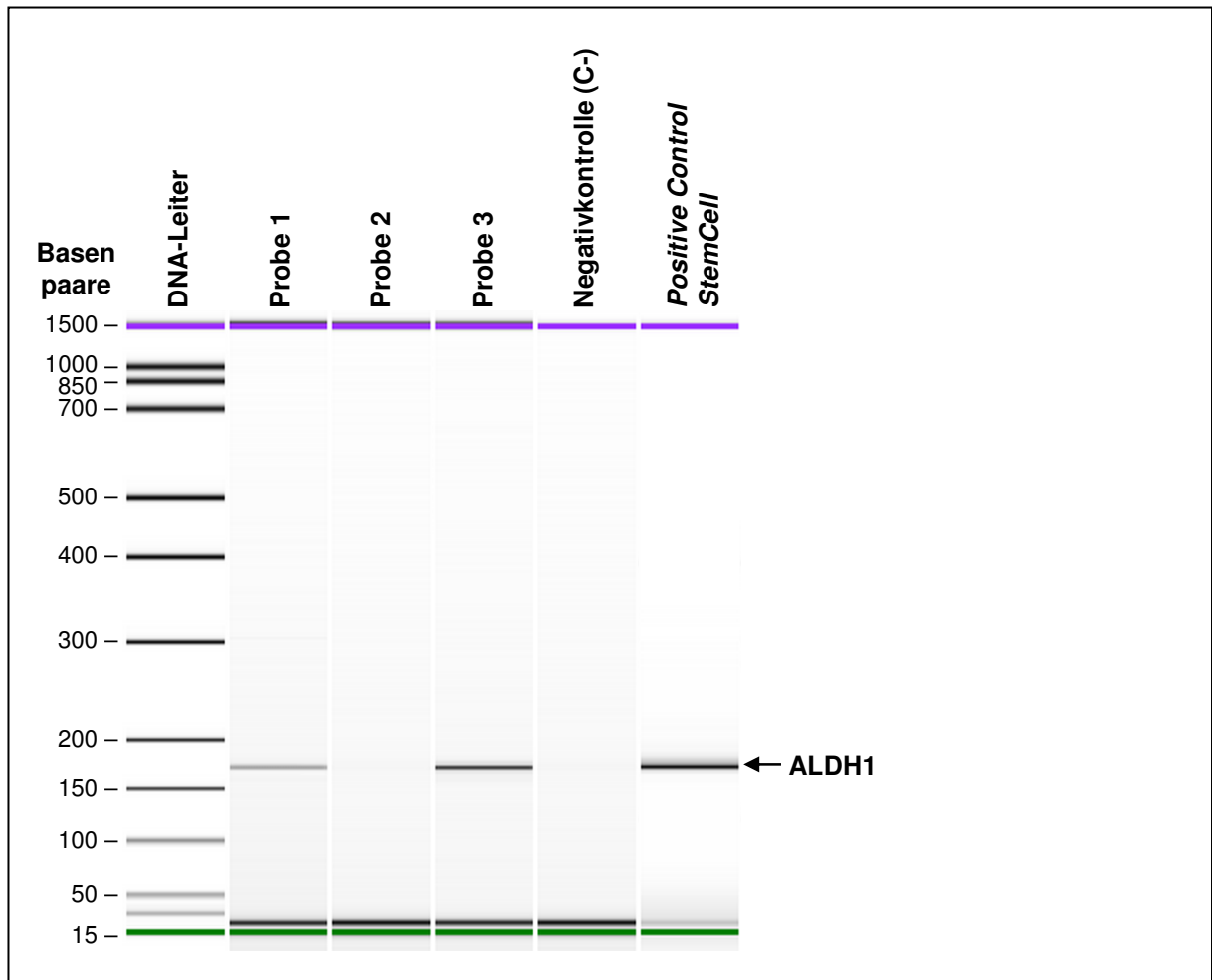
Negativkontrolle und RT-Kontrolle dürfen keine Banden enthalten, die größer sind als 80 Basenpaare (Primerdimere).

Die Detektion von Fragmenten mit einer Größe von mehr als 1000 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. 2: AdnaTest EMT-2/StemCellDetect Ergebnisse nach Analyse durch einen Agilent 2100 Bioanalyser: Tumorstammzell-assoziierte Genexpression**

Die erste Spur enthält den DNA-Größenstandard (DNA-Leiter). Die Proben 1 und 3 sind positiv für ALDH1 und Probe 2 ist negativ. Die beiden letzten Spuren enthalten die PCR Negativkontrolle (C-) und die *Positive Control StemCell*.

## **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 EMT-2/StemCellDetect*

<b>Bestandteile</b>	<i>Lysis/Binding Buffer</i>	3
	<i>Oligo (dT)<sub>25</sub> Beads</i>	4
	<i>Buffer A</i>	5
	<i>Buffer B</i>	6
	<i>10 mM Tris-HCl</i>	7
	<i>PrimerMix EMT-2</i>	11
	<i>Positive Control EMT-2</i>	12
	<i>PrimerMix StemCell</i>	13
	<i>Positive Control StemCell</i>	14
<b>Sie benötigen</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 0.2 ml PCR-Gefäße</li><li>• 1x 1.5 ml Reaktionsgefäß je Probe</li><li>• Pipetten und Pipettenspitzen (RNase-frei) für 1 - 200 µl</li><li>• <i>Sensiscript</i> RT Kit (QIAGEN)</li><li>• <i>HotStarTaq Master Mix</i> Kit (QIAGEN)</li></ul>	

## 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 Zellysat 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 50 °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	4.0 µl
		dNTPs	4.0 µl
		<i>Sensiscript Reverse Transcriptase (SRT)</i>	2.0 µl
	RNase Inhibitor, 40 U/µl (Promega)		0.5 µl
<b>Proben</b>	mRNA/Bead-Komplex oder RT-Kontrolle (RNase-freies Wasser) je <sup>(1)</sup> :		29.5 µl
<b>Gesamtvolumen</b>			40.0 µl

<sup>1)</sup> **Hinweis:** Als RT-Kontrolle geben Sie 29.5 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	60min
93 °C	5 min
4 °C	∞

Fahren Sie fort mit:

- Multiplex-PCR, Tabelle 10 und Tabelle 11  
→ EMT-2-assoziierte Genexpression
- Singleplex-PCR, Tabelle 12 und Tabelle 13  
→ Tumorstammzell-assoziierte Genexpression

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

**Tabelle 10: Vorbereitung der Multiplex-PCR (EMT-2)**

Komponenten		Volumen
<b>PCR Master Mix</b>	HotStarTaq Master Mix	12.5 µl
	RNase-freies Wasser	4.5 µl
	<i>PrimerMix EMT-2</i> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">1 1</span>	4.0 µl
<b>Proben</b>	cDNA oder RT-Kontrolle oder Negativkontrolle (RNase-freies Wasser) oder <i>Positive Control EMT-2</i> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">1 2</span> je:	4.0 µl
<b>Gesamtvolumen</b>		25.0 µl

- Die PCR wird mit insgesamt 35 Zyklen durchgeführt.

**Tabelle 11: PCR-Programm (EMT-2)**

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

**Tabelle 12: Vorbereitung der Singleplex-PCR (StemCell)**

Komponenten		Volumen
<b>PCR Master Mix</b>	HotStarTaq Master Mix	12.5 µl
	RNase-freies Wasser	4.5 µl
	<i>PrimerMix StemCell</i> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">13</span>	4.0 µl
<b>Proben</b>	cDNA oder RT-Kontrolle oder Negativkontrolle (RNase-freies Wasser) oder <i>Positive Control StemCell</i> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">14</span> je:	4.0 µl
<b>Gesamtvolumen</b>		25.0 µl

- Die PCR wird mit insgesamt 35 Zyklen durchgeführt.

**Tabelle 13: PCR-Programm (StemCell)**

95 °C	15min	} 35 Zyklen
94 °C	30sec	
51 °C	30sec	
72 °C	30sec	
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

- Für die Fragmentanalyse empfehlen wir die Verwendung eines Agilent 2100 Bioanalyzers.



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)