

Version 150605 DE

AdnaTest *EMT-2/StemCellSelect*

**Anreicherung von Tumorzellen aus Blut
zur Genexpressionsanalyse**

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	10
Protokoll.....	12
A. Vorbereitung der Select Beads	12
B. Selektion von Tumorzellen	13
Literatur.....	15
Kurzanleitung.....	16

Bestellinformation

Detaillierte Informationen über unsere Produkte und die Adressen unserer Distributoren finden Sie auf unserer Webseite unter 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).

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/StemCellSelect* wurde für die Anreicherung von zirkulierenden Tumorzellen aus dem Blut entwickelt und ist ausschließlich für Forschungszwecke bestimmt.

Mit dem *AdnaTest EMT-2/StemCellDetect* werden die angereicherten Zellen auf die Expression von molekularen Markern untersucht, die mit der Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT) bzw. mit Tumorstammzellen assoziiert werden. 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%.

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

Abkürzungen und Symbole

<i>AdnaMag-L</i>	Magnetpartikelkonzentrator (groß, "-large")
<i>AdnaMag-S</i>	Magnetpartikelkonzentrator (klein, "-small")
bp	Basenpaare
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
	Haltbarkeitsdatum
	Lagerungstemperatur
	Artikelnummer
	Gebrauchsanweisung beachten
	Hergestellt von

Patente und eingetragene Markenzeichen

Dynabeads® ist ein eingetragenes Markenzeichen der Firmen Invitrogen und Life Technologies Corporation.

Produktbeschreibung

Der *AdnaTest EMT-2/StemCellSelect* ermöglicht die immunomagnetische Anreicherung von Tumorzellen über epitheliale und tumorassoziierte Antigene.

Antikörper, die an Magnetpartikel (Dynabeads®) gekoppelt sind, binden an epitheliale und tumorassoziierte Antigene von Tumorzellen im Blut. Die auf diese Weise markierten Zellen können anschließend unter Verwendung eines Magnetpartikelkonzentrators (*AdnaMag-L* und *AdnaMag-S*) isoliert werden (Abb. 1).

Das Lysat der angereicherten Zellen wird für weitere Analysen mittels des *AdnaTest EMT-2/StemCellDetect* verwendet.

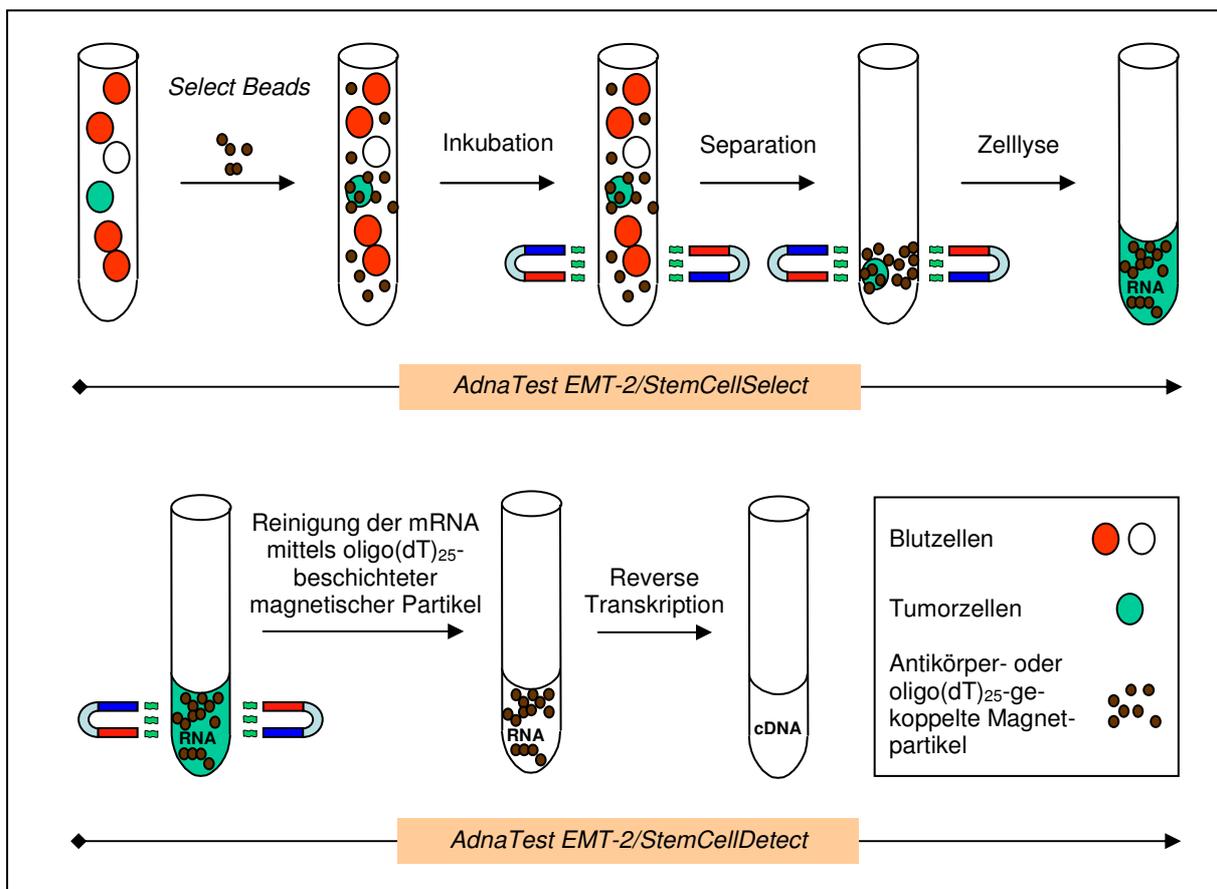


Abb. 1: Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung.

Kit-Bestandteile

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

Tabelle 1: Kit-Bestandteile

Komponente	Symbol	T-1-537 (12 Tests)
<i>Select Beads</i>	1	1
<i>Lysis/Binding Buffer</i>	2	1
<i>AdnaWash</i>	15	2

Vom Anwender bereitzustellen

Geräte:

- Überkopfmischer für 15 ml und 1.5 ml Gefäße
- Magnetpartikelkonzentratoren
AdnaMag-L (QIAGEN Hannover GmbH, Artikel-Nr. T-1-700)
AdnaMag-S (QIAGEN Hannover GmbH, Artikel-Nr. T-1-800)

Verbrauchsmaterialien:

- Sterile, RNase-freie 10 ml Glas- oder Plastikpipetten und Pipettierhilfe
- Sterile, RNase-freie 1.5 ml Reaktionsgefäße (z. B. Sarstedt, Artikel-Nr. 72.690)
- 15 ml Röhren (sterile, RNase-freie Polypropylen-Röhren empfohlen; z. B. Sarstedt, Artikel-Nr. 65.554.502)
- Pipetten und RNase-freie Pipettenspitzen mit Filter als Aerosolbarriere zum Pipettieren von Volumina zwischen 100 µl und 1000 µl
- Schutzhandschuhe, Schutzbrille

Reagenzien:

- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7.0 - 7.3 (z. B. Fisher, Artikel-Nr. VX14190169, D-PBS)

Lagerung

Der *AdnaTest EMT-2/StemCellSelect* wird bei +4 °C gelagert und darf nur bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. Wir empfehlen, den Puffer *AdnaWash* 15 zu aliquotieren und für die langfristige Lagerung separat bei -20 °C aufzubewahren, um Kontaminationen und wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden.

Besondere Anwendungshinweise

Der Test darf nur von Fachpersonal durchgeführt werden, das molekularbiologische Techniken beherrscht.

Probennahme:

- Die Blutprobe muss entnommen werden, bevor Chemotherapeutika appliziert werden. Der *AdnaTest* darf nur angewendet werden, wenn seit der letzten Verabreichung von Chemotherapeutika mindestens 5 Tage vergangen sind!
- Blutentnahme: Unter Verwendung von *AdnaCollect* Blutentnahmesystemen (Artikel-Nr. T-1-600, QIAGEN Hannover GmbH) oder EDTA-enthaltenden Abnahmesystemen (z. B. 'S Monovette® Kalium EDTA', Sarstedt; 'BD Vacutainer® K3EDTA', Becton Dickinson) werden mindestens 5 ml Vollblut entnommen.
- Das entnommene Blut sofort bei 4 °C aufbewahren.
- **Die Bearbeitung der Proben sollte schnellstmöglich erfolgen, spätestens jedoch 4 Stunden nach Blutentnahme bei Verwendung von EDTA-haltigen Abnahmesystemen bzw. 24 Stunden nach Blutentnahme bei Verwendung von *AdnaCollect*.**
- Es muss sichergestellt werden, dass das Blut nicht hämolysiert ist.

Handhabung:

- Die *Select Beads* 1 enthalten Natriumazid als Bakterizid. Natriumazid ist zytotoxisch und muss daher vor der Verwendung der Beads entfernt werden.
- 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.
- Wir empfehlen, die *Select Beads* zu aliquotieren, um Kontaminationen zu vermeiden.



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

- Proben müssen verworfen werden, wenn die *Select Beads* während der Zellanreicherung Klumpen bilden.
- 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

A. Vorbereitung der Select Beads

Die *Select Beads* müssen kurz vor der Verwendung gewaschen werden, um das Natriumazid zu entfernen:

1. *Select Beads* 1 mit einer Pipette sorgfältig resuspendieren; nicht vortexen!
2. Entsprechend der Probenzahl jeweils 100 µl *Select Beads* 1 entnehmen und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführen. Bei mehr als 10 Proben ein weiteres 1.5 ml Reaktionsgefäße benutzen.
3. Reaktionsgefäß in den *AdnaMag-S* stellen.
4. Nach 1 min den Überstand mit einer Pipette vorsichtig entfernen.

Wichtig während der gesamten Durchführung:

Beim Abnehmen des Überstandes die Beads nicht berühren!

5. Waschschritte
 - a. Magnetschieber aus dem *AdnaMag-S* herausnehmen.
 - b. 1 ml PBS zugeben; Beads durch mehrmaliges Pipettieren resuspendieren.
 - c. Magnetschieber in den *AdnaMag-S* einsetzen.
 - d. Nach 1 min den Überstand vollständig entfernen.

Zweimal wiederholen (insgesamt 3 Waschschritte).

6. Das Reaktionsgefäß aus dem *AdnaMag-S* nehmen und die Beads mit dem ursprünglichen Volumen PBS (100 µl je Probe) resuspendieren.

B. Selektion von Tumorzellen

1. Jeweils 5 ml Blut in ein 15 ml Röhrchen überführen. (Nur empfohlene Blutentnahmesysteme verwenden, s. Seite 10)
2. *Select Beads* (aus Schritt A6) durch mehrmaliges Pipettieren sorgfältig resuspendieren und pro Blutprobe je 100 µl Beads zusetzen.
3. Die Röhrchen für 30 min bei Raumtemperatur in einem Überkopfmischer, der Drehen mit Neigung ermöglicht, langsam drehen lassen (~5 rpm).
4. Röhrchen in den *AdnaMag-L* ohne Magnetschieber stellen. Durch Abwärtsschwingen des *AdnaMag-L* die am Deckel der Gefäße hängenden Blutropfen ablösen.
5. Den Magnetschieber einsetzen und die Röhrchen für 3 min bei Raumtemperatur im *AdnaMag-L* stehen lassen.
6. In der Zwischenzeit *AdnaWash* [15] und *Lysis/Binding Buffer* [2] auf Raumtemperatur erwärmen.

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

7. Blutüberstand mit einer 10 ml Pipette vollständig entfernen, ohne dabei die Beads zu berühren.
8. Waschschritte
 - a. Magnetschieber aus dem *AdnaMag-L* herausnehmen.
 - b. 5 ml *AdnaWash* zugeben, die Röhrchen schließen und den *AdnaMag-L* 5x über Kopf schwenken, um die Magnetpartikel/Zell-Komplexe schonend zu resuspendieren.

- c. Den *AdnaMag-L* mit den Röhrrchen zweimal nach unten schwingen, um am Deckel hängende Tropfen abzulösen.
- d. Magnetschieber einsetzen für 3 min bei Raumtemperatur im *AdnaMag-L* stehen lassen.
- e. Überstand mit einer Pipette vollständig entfernen.

Zweimal wiederholen (insgesamt 3 Waschschritte).

- 9. Magnetschieber aus dem *AdnaMag-L* herausnehmen.
- 10. Magnetpartikel/Zell-Komplexe in 1 ml *AdnaWash* resuspendieren und in ein 1.5 ml-Reaktionsgefäß überführen.
- 11. Reaktionsgefäße in den *AdnaMag-S* mit eingesetztem Magnetschieber 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.

- 12. Nach 3 min den Überstand mit einer Pipette entfernen.
- 13. Magnetschieber aus dem *AdnaMag-S* herausnehmen.
- 14. Magnetpartikel/Zell-Komplexe in 1 ml PBS resuspendieren.
- 15. Magnetschieber in den *AdnaMag-S* einsetzen.
- 16. Nach 1 min den Überstand mit einer Pipette **vollständig** entfernen. Dies ist wichtig für die anschließende Zellyse!
- 17. Magnetschieber aus dem *AdnaMag-S* herausnehmen.
- 18. Zugabe von 200 µl *Lysis/Binding Buffer* 2 (auf Raumtemperatur erwärmt) in jedes Reaktionsgefäß. Durch 5maliges Auf- und Abpipettieren die Magnetpartikel/Zell-Komplexe resuspendieren.

19. Magnetschieber einsetzen und die Röhren für 1 min bei Raumtemperatur im *AdnaMag-S* stehen lassen.
20. Überstand (Zelllysat) in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführen.
21. Reaktionsgefäß mit den Magnetpartikeln verwerfen.
22. Umgehend mit der mRNA-Isolierung (*AdnaTest EMT-2/Stem CellDetect*) beginnen oder Zelllysat für maximal 2 Wochen bei -20 °C lagern.

Literatur

Literaturhinweise finden Sie auf unserer Web-Seite

<http://www.adnagen.com>

Kurzanleitung

AdnaTest EMT-2/StemCellSelect

Bestandteile	<i>Select Beads</i>	1
	<i>Lysis/Binding Buffer</i>	2
	<i>AdnaWash</i>	15
Sie benötigen pro Ansatz	<ul style="list-style-type: none">• 5 ml Vollblut (Details s. Seite 10)• 1x 15 ml Röhrchen• 2x 1.5 ml Reaktionsgefäße• 10 ml Glas- oder Kunststoffpipetten (RNase-frei) und Pipettierhilfe• 100 - 1000 µl Pipetten und Pipettenspitzen (RNase-frei)	

Hinweis: Soweit nicht anders beschrieben, werden die Reaktionsgefäße für die Separation der *Select Beads* mit *AdnaWash* immer für 3 min bzw. mit PBS immer für 1 min in den *AdnaMag-L* bzw. *AdnaMag-S* gestellt.

Protokoll

- *Select Beads* 1 durch mehrmaliges Pipettieren sorgfältig resuspendieren und pro Blutprobe je 100 µl Beads in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführen.
- *Select Beads* mit 3x 1 ml PBS waschen.
- Resuspendieren der *Select Beads* in 100 µl PBS je Blutprobe.
- 5 ml Vollblut in ein 15 ml Röhrchen überführen.
- Zugabe von 100 µl der gewaschenen *Select Beads* zu jeder Blutprobe.

- 30 min bei Raumtemperatur in einem Überkopfmischer (Drehen mit Neigung) langsam drehen lassen (~5 rpm).
- Röhrchen für 3 min in den *AdnaMag-L* stellen. Durch Abwärtschwingen des *AdnaMag-L* die am Deckel der Gefäße hängenden Blutropfen ablösen.
- Blutüberstand mit einer Pipette entfernen.
- Beads mit 3 x 5 ml *AdnaWash* waschen.
- Beads in 1 ml *AdnaWash* resuspendieren und in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführen.
- Beads für 3 min im *AdnaMag-S* separieren und Überstand entfernen.
- Waschen der Beads mit 1 ml PBS.
- Beads für 1 min im *AdnaMag-S* separieren und Überstand entfernen.
- Aufnehmen der Beads in 200 µl *Lysis/Binding Buffer* 2 und durch 5maliges Auf- und Abpipettieren resuspendieren.
- Beads für 1 min im *AdnaMag-S* separieren und Überstand (Zelllysate) in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführen.

Umgehend mit dem *AdnaTest EMT-2/StemCellDetect* fortfahren oder Zelllysate für maximal 2 Wochen bei -20 °C lagern.



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

Internet: www.adnagen.com