

Version 150710 DE

AdnaTest EMT-2/StemCell Add-on ColonDetect

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

Nur für Forschungszwecke

Gebrauchsanweisung

REF T-1-537-PC

Inhaltsverzeichnis

Bestellinformation	3
Anwendungszweck	3
Abkürzungen und Symbole.....	4
Patente und eingetragene Markenzeichen	4
Produktbeschreibung.....	5
Kit-Bestandteile.....	5
Vom Anwender bereitzustellen	6
Lagerung.....	7
Besondere Anwendungshinweise	7
Protokoll.....	8
A. Multiplex-PCR.....	8
B. Fragmentanalyse	9
Literatur.....	12
Fehlerbehebung.....	12
Kurzanleitung	13

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).

Anwendungszweck

Das *AdnaTest EMT-2/StemCell Add-on ColonDetect* dient dem Nachweis von Darmkrebs-assoziiierter Genexpression in immunomagnetisch angereicherten Tumorzellen mittels PCR und ist ausschließlich für Forschungszwecke bestimmt. Der Nachweis erfolgt dabei mit einer Spezifität von mindestens 90%. Die Wiederfindung von 5 Zellen je Testansatz liegt in Spiking-Experimenten bei mindestens 90%.

Die Anreicherung von zirkulierenden Tumorzellen aus peripherem Blut sowie die reverse Transkription erfolgen unter Verwendung des *AdnaTest EMT-2/StemCell*.

Abkürzungen und Symbole

bp	Basenpaare
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C+	Positivkontrolle
C-	Negativkontrolle
CEA	Carcinoembryonales Antigen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
GA733-2	Gastrointestinal tumorassoziiertes Antigen 733-2
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PR	Progesteronrezeptor
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. Das Warenzeichen *HotStarTaq* wurde von der Firma QIAGEN, Hilden, eingetragen. *LabChip* ist ein eingetragenes Warenzeichen der Caliper Technologies Corp., Kalifornien, US.

Produktbeschreibung

Mit dem *PrimerMix ColonDetect* können drei Darmkrebs-assoziierte Gene sowie ein Kontroll-Gen untersucht werden. Die Primer erzeugen Fragmente der folgenden Größen:

GA733-2: 395 bp

CEA: 231 bp

EGFR: 163 bp

Aktin: 120 bp (interne PCR-Kontrolle)

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

Kit-Bestandteile

Das *AdnaTest EMT-2/StemCell Add-on ColonDetect* enthält die folgenden Komponenten:

Tabelle 1: Kit-Bestandteile

Komponente	Symbol	T-1-537-PC (12 Tests)
<i>PrimerMix ColonDetect</i>	8	1
<i>Positive Control Colon (C+)</i>	9	1

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

Vom Anwender bereitzustellen

Geräte:

- 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:

- *HotStarTaq Master Mix* Kit (QIAGEN, Artikel-Nr. 203443, 250 U)

Lagerung

Der *AdnaTest EMT-2/StemCell Add-on ColonDetect* wird bei -20 °C gelagert und darf nur bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. 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 (*AdnaTest EMT-2/StemCell*) 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. Multiplex-PCR

1. Den *HotStarTaq Master Mix* (QIAGEN), RNase-freies Wasser, *PrimerMix ColonDetect* [8] und *Positive Control Colon (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 2.

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 42.0 µl des Master Mix in ein 0.2 ml PCR-Reaktionsgefäß pipettieren, den cDNA/Bead-Komplex durch Pipettieren gründlich mischen und 8.0 µl in das Reaktionsgefäß mit dem Master Mix geben.

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

Tabelle 2: Vorbereitung der Multiplex-PCR

Komponenten		Volumen
PCR Master Mix	HotStarTaq Master Mix	25.0 µl
	RNase-freies Wasser	13.0 µl
	<i>PrimerMix ColonDetect</i> [8]	4.0 µl
Proben	cDNA oder RT-Kontrolle oder Negativkontrolle (RNase-freies Wasser) oder <i>Positive Control Colon (C+)</i> [9] je:	8.0 µl
Gesamtvolumen		50.0 µl

Die PCR erfolgt in einem Thermocycler gemäß des in Tabelle 3 beschriebenen Programms mit insgesamt 38 Zyklen. Die Heizrate des Thermocyclers ist auf 2 °C/Sekunde einzustellen.

Tabelle 3: PCR-Programm

95 °C	15min	} 38 Zyklen
94 °C	45sec	
58 °C	45sec	
72 °C	45sec	
72 °C	10min	
4 °C	∞	

B. 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

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

Bei Verwendung des Agilent 2100 Bioanalyzers sind Peaks mit einer Konzentration von ≥ 0.10 ng/ μ l 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.

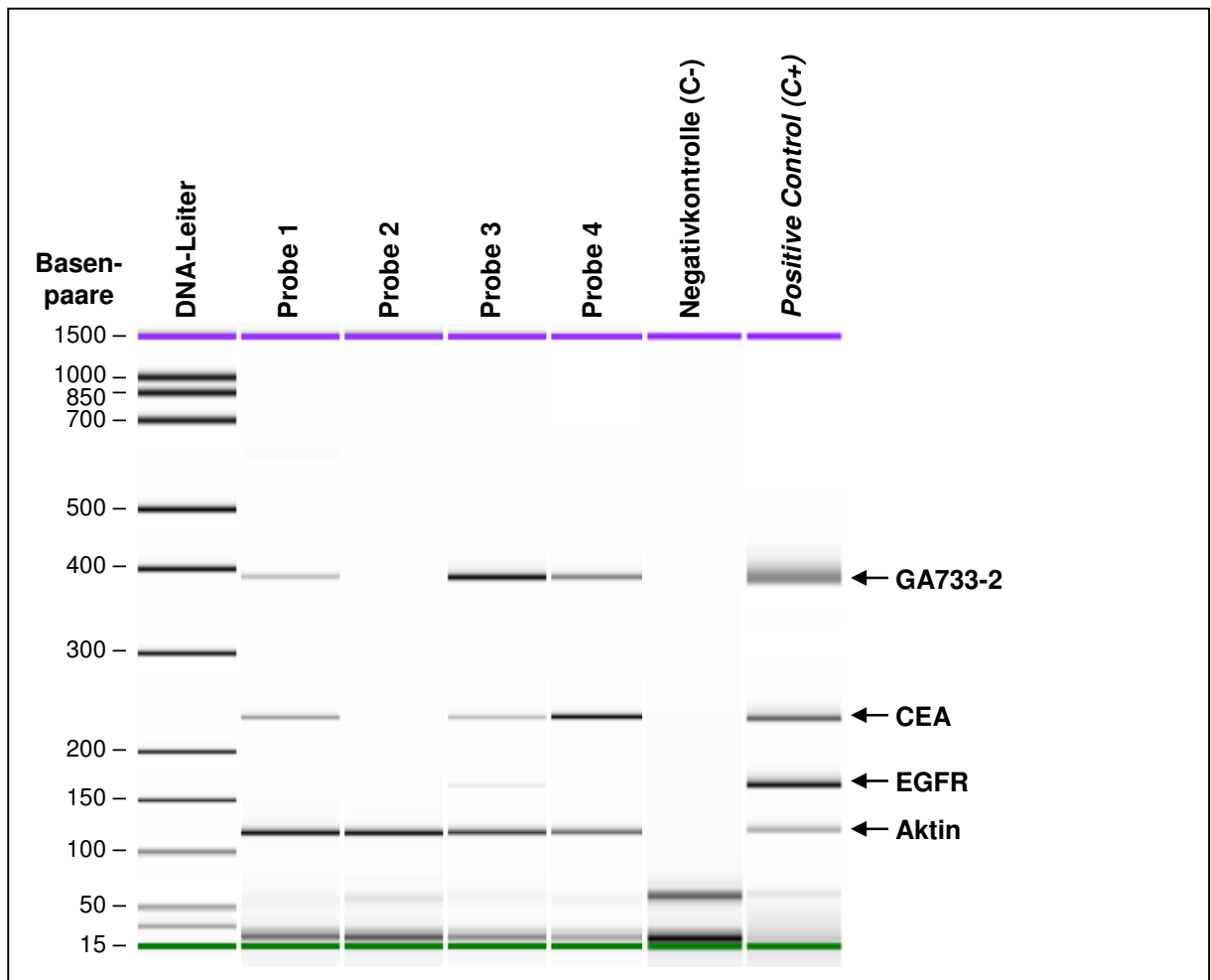


Abb. 1: AdnaTest EMT-2/StemCell Add-on ColonDetect Ergebnisse nach Analyse durch einen Agilent 2100 Bioanalyser

Die erste Spur enthält den DNA-Größenstandard (DNA-Leiter). Die Proben 1 und 4 sind positiv für GA733-2 und CEA, Probe 2 ist negativ und Probe 3 ist positiv für GA733-2, CEA and EGFR. Aktin ist in den Proben 1 bis 4 nachweisbar. Die beiden letzten Spuren enthalten die PCR Negativkontrolle (C-) und die *Positive Control Colon (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 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/StemCell Add-on ColonDetect

Bestandteile	<i>PrimerMix ColonDetect</i>	8
	<i>Positive Control Colon (C+)</i>	9
Sie benötigen	<ul style="list-style-type: none"> • 0.2 ml PCR-Gefäße • Pipetten und Pipettenspitzen (RNase-frei) für 4 - 200 µl • <i>HotStarTaq Master Mix Kit</i> (QIAGEN) 	

Die Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmen, mischen und auf Eis stellen.

Tabelle 4: Multiplex-PCR

Komponenten		Volumen
PCR Master Mix	<i>HotStarTaq Master Mix</i>	25.0 µl
	RNase-freies Wasser	13.0 µl
	<i>PrimerMix ColonDetect</i> 8	4.0 µl
Proben	cDNA oder RT-Kontrolle oder Negativkontrolle (RNase-freies Wasser) oder <i>Positive Control Colon (C+)</i> 9 je:	8.0 µl
Gesamtvolumen		50.0 µl

- Die PCR wird mit insgesamt 38 Zyklen durchgeführt.

Tabelle 5: PCR-Programm

95 °C	15min	} 38 Zyklen
94 °C	45sec	
58 °C	45sec	
2 °C	45sec	
72 °C	10min	
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

Internet: www.adnagen.com