

Mars 2017

Bruksanvisning för AdnaTest OvarianCancerSelect och OvarianCancerDetect



12 (katalognummer 395442)



12 (katalognummer 396442)

För anrikning av tumörceller från helblod från patienter med äggstockcancer samt
identifiering av äggstockcancer-associerat genuttryck i anrikade tumörceller
För in vitro-diagnostisk användning
Version 1



395442 (AdnaTest OvarianCancerSelect)
396442 (AdnaTest OvarianCancerDetect)



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND



1106498SV



Innehåll

Avsedd användning	4
Sammanfattning och förklaring	4
Testprincip	5
AdnaTest OvarianCancerSelect	5
AdnaTest OvarianCancerDetect	5
Material som medföljer	7
Kitinnehåll	7
Material som behövs men inte medföljer	9
AdnaTest OvarianCancerSelect	9
AdnaTest OvarianCancerDetect	10
Varningar och försiktighet	11
Säkerhetsinformation	11
Användningsinformation	11
Patent	11
Förvaring och hantering av reagenser	11
Förvaring	11
Hantering	12
Förvaring och hantering av prover	13
Provberedning	13
Protokoll: Anrikning av tumörceller med AdnaTest OvarianCancerSelect	14
Protokoll: Detektion av äggstockscancer-associerat genuttryck i anrikade tumörceller med hjälp av AdnaTest OvarianCancerDetect	17

Protokoll: Multiplex och Duplex PCR.....	22
Tolkning av resultat	26
Fragmentanalys på Agilent 2100 Bioanalyser	26
Felsökningshandbok	30
Kvalitetskontroll	30
Begränsningar.....	30
Prestandaegenskaper	31
Utbyte	31
Specificitet.....	31
Reproducerbarhet.....	32
Precision	32
Interfererande substanser.....	33
Interfererande tillstånd.....	34
Kliniska studier	35
Förkortningar	36
Symboler	37
Beställningsinformation	38

Avsedd användning

AdnaTest OvarianCancerSelect är en in vitro-diagnostisk metod för immunokemisk anrikning av cirkulerande tumörceller från antikoagulerade helblodsprover som erhållits från patienter med äggstockscancer genom en kombination av epiteliälala och tumörassocierade antigener.

AdnaTest OvarianCancerDetect är en in vitro-diagnostisk analys för analys av expressionsprofiler för tumörceller genom omvänd transkription och multiplex-PCR samt efterföljande densitometrisk analys av PCR-produkter via automatiserad kapillär elektrofores med hjälp av Agilent® 2100 Bioanalyser.

AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect är inte avsedd för screening och ska inte användas som ett diagnostiskt test för att bekräfta äggstockscancer.

Produkten är avsedd att användas av yrkesanvändare, såsom tekniker och läkare som är utbildade i molekylärbiologiska metoder.

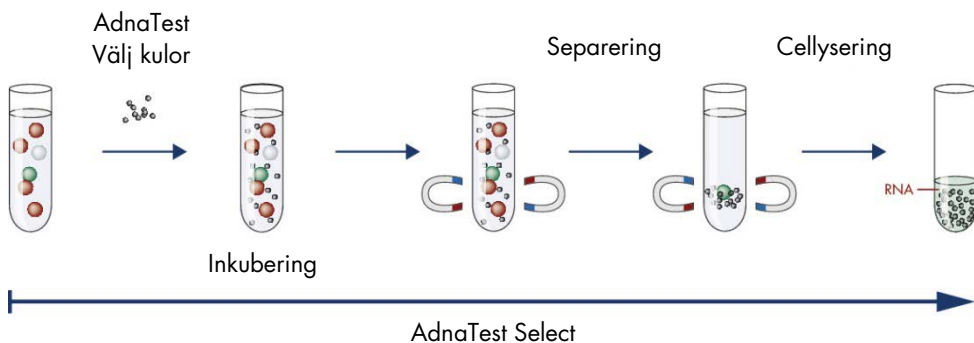
Sammanfattning och förklaring

AdnaTest OvarianCancerSelect möjliggör immunomagnetisk anrikning av tumörceller via epiteliälala och tumörassocierade antigener. AdnaTest OvarianCancerDetect används för analys av äggstockscancer-associerat genuttryck i immunomagnetiskt anrikade tumörceller genom omvänd transkription och PCR.

Testprincip

AdnaTest OvarianCancerSelect

Antikroppar mot epiteliäla och tumörassocierade antigener konjugeras till magnetiska kulor för märkning av tumörceller i helblod. Märkta celler extraheras med hjälp av en koncentrator för magnetiska partiklar (AdnaMag-L och AdnaMag-S) och lyseras sedan (figur 1 och 2).



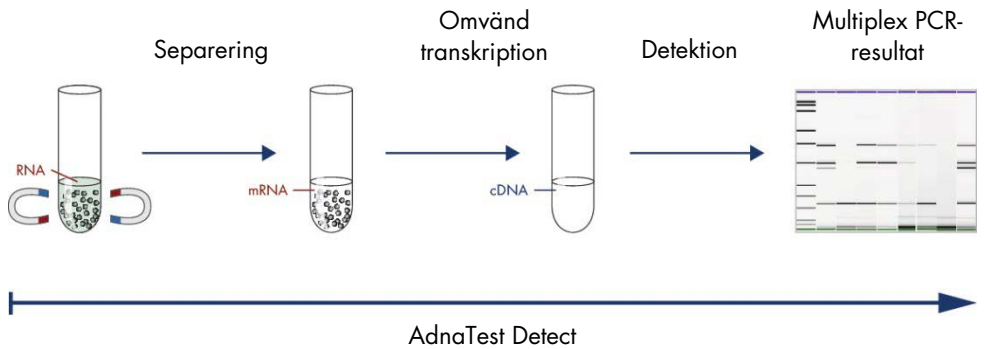
- ● Blodceller ● Tumörceller
- ⊗ Antikropps- eller Oligo (dT)₂₅-belagda magnetiska kulor

Bild 1. AdnaTest OvarianCancerSelect Immunomagnetiskt cellval med flera tumörassocierade antikroppar.

Celllysaten används för vidare analys med AdnaTest OvarianCancerDetect.

AdnaTest OvarianCancerDetect

AdnaTest OvarianCancerDetect innehåller Oligo (dT)₂₅-kulor för isolering av mRNA från lysatet av föranrikade tumörceller. Omvänd transkription resulterar i cDNA, vilket sedan används som mall för detektion och karakterisering av tumörceller genom multiplex-/duplex-PCR. AdnaTest OvarianDetect möjliggör amplifiering av tre tumörassocierade antigener och en kontrollgen. *AdnaTest ERCC1-Detect* amplifierar ERCC1-genen (excision repair cross-complementing 1-genen) och en kontrollgen.



- Blodceller ● Tumörceller
- ⊗ Antikropps- eller Oligo (dT)25-belagda magnetiska kulor

Bild 2. AdnaTest OvarianCancerDetect: Multiplex-PCR av olika cancerassocierade tumörmarkörer. I ett andra steg, undersöks de anrikade cellerna av RT-PCR för tumörassocierade uttrycksmönster. mRNA-strängarna genomgår omvänd transkription till cDNA. Därefter kan flera associerade tumörmarkörer amplifieras med multiplex-PCR och visualiseras.

De två primermixarna genererar följande fragmentstorlekar:

PrimerMix OvarianDetect

- CA125: 432 bp
- GA733-2: 395 bp
- Muc-1: 299 bp
- Aktin: 120 bp (intern PCR-kontroll)

PrimerMix ERCC1-Detect

- ERCC1: 357 bp
- Aktin: 120 bp (intern PCR-kontroll)

Obs: Fragmentstorlekarna kan variera något. Använd AdnaTest Positive Control Ovarian och AdnaTest Positive Control ERCC1 för tilldelning av detekterade signaler.

Material som medföljer

Kitinnehåll

AdnaTest OvarianCancerSelect			
Katalognummer		395442	
Antal tester		12	
Insamlingsrör	Collection Tubes (Insamlingsrör) (15 ml)	COL TUBE	3 x 5
Insamlingsrör	Collection Tubes (Insamlingsrör) (1,5 ml)	COL TUBE	24
Röd	OvarianSelect Beads (OvarianSelect-kulor)	OSB	1,2 ml
Röd	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (lyserings-/ bindningsbuffert)	LBB	2 x 1,2 ml
	Handbok		1

AdnaTest OvarianCancerDetect			
Katalognummer	396442		
Antal tester	12		
AdnaTest RNA-reagenter			
Ask 1			
Röd	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (lyserings-/bindningsbuffert)	LBB	2 ml
Orange	Oligo(dT) ₂₅ Beads (kulor)	OdT	280 µl
Vit	RNA Purification Buffer A (RNA-reningsbuffert A)	BA	4 ml
Vit	RNA Purification Buffer B (RNA-reningsbuffert B)	BB	4 ml
Lila	Tris-HCL Buffer (Tris-HCL-buffert)	TB	2 ml
AdnaTest OvarianCancerDetect			
Ask 2			
Blått	AdnaTest PrimerMix ProstateDetect	PMO	144 µl
Orange	AdnaTest Positive Control Ovarian (C+)	CONTROL +	56 µl
Blå	AdnaTest PrimerMix ERCC1-Detect	PME	144 µl
Orange	AdnaTest Positive Control ERCC1 (C+)	CONTROL +	56 µl
	Handbok		1

AdnaTest OvarianCancerDetect-reagenserna räcker till att analysera 6 PCR-kontroller och 12 blodprover.

Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (SDS) som kan erhållas av produktleverantören.

AdnaTest OvarianCancerSelect

Utrustning

- Tube rotator for 15 ml and 1.5 ml tubes (Rörroterare för 15 ml och 1,5 ml rör) (t.ex. ELMi Ltd., kat.nr IMIX-03)
- Koncentratorer för magnetiska partiklar
 - AdnaMag-L (kat.nr 399921)
 - AdnaMag-S (kat.nr 399911)

Material

- AdnaTubes (rör) (kat.nr 399932), vid användning med BD Vacutainer® ACD-A-rör
- Sterila, RNase-fria 10 ml-pipetter och pipetterare av glas eller plast
- Sterile, RNase-free 1.5 ml reaction tubes (sterila, RNase-fria 1,5 ml-reaktionsrör) (t.ex. Sarstedt, kat.nr 72.690)
- Pipetter och RNase-fria pipettspetsar med aerosolbarriär, lämpliga för pipettering av volymer från 100 µl till 1 000 µl

Reagenser

- Phosphate buffered saline (Fosfatbuffrad saltlösning) (PBS), pH 7,0–7,3 (t.ex. Fisher, kat.nr VX14190169, D-PBS)

AdnaTest OvarianCancerDetect

Utrustning

- Tube rotator for 1.5 ml tubes (rörroterare för 1,5 ml rör) (t.ex. ELMI Ltd., kat.nr IMIX-03)
- Magnetic particle concentrator AdnaMag-S (koncentratorer för magnetiska partiklar AdnaMag-S) (kat.nr 399911)
- Värmeblock eller vattenbad (50°C)
- Termocykler med uppvärmt lock och en uppvärmningshastighet på 2°C/s
- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)

Material

- Sterila, RNase-fria 0,2 ml-PCR-rör med tunna väggar
- Sterile, RNase-free 1.5 ml reaction tubes (sterila, RNase-fria 1,5 ml-reaktionsrör) (t.ex. Sarstedt, kat.nr 72.690)
- Pipetter och RNase-fria pipettspetsar med aerosolbarriär, lämpliga för pipettering av volymer från 1 µl till 200 µl

Reagenser

- Sensiscript® RT Kit (QIAGEN, kat. nr. 205211, 50 reaktioner)
 - **Obs:** Sensiscript RT Kit (kat.nr 205211) räcker endast till 25 prover eftersom det krävs dubbel volym för varje reaktion.
- Recombinant RNAsin, RNase-inhibitor (RNase-hämmare), 2,500 U (Promega, kat.nr N2511)
- HotStarTaq® Master Mix Kit (huvudmixkit) (QIAGEN, kat. nr. 203443, 250 U)
- Krossad is

Varningar och försiktighet

För in vitro-diagnostisk användning

Säkerhetsinformation

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Ytterligare information finns i aktuella säkerhetsdatablad (SDS:er). De är tillgängliga på webben i behändigt PDF-format på www.qiagen.com/safety där du kan visa och skriva ut säkerhetsdatablad för varje QIAGEN-kit och kitkomponent.

Kassera avfall från prover och analyser i enlighet med lokala säkerhetsregler.

Användningsinformation

De här testerna måste utföras av personal som är utbildad inom molekylärbioogitekniker.

Patent

AdnaTest OvarianCancerDetect kräver licenser från Hoffmann-La Roche AG, Basel. Köpet av AdnaTest OvarianCancerDetect ger inte användaren behörighet att utföra PCR utan licens.

Förvaring och hantering av reagenser

Förvaring

AdnaTest OvarianCancer-systemet levereras i tre askar. AdnaTest OvarianCancerSelect (kat. nr. 395442) och AdnaTest RNA Reagensask 1 (Ask 1 med kat.nr. 396442) måste förvaras vid 2–8°C. Komponenterna får inte användas efter förfallodatumet.

AdnaTest OvarianCancerDetect Ask 2 (Ask 2 med kat.nr 396442), vilken innehåller AdnaTest PrimerMixes och AdnaTest positiva kontroller, måste lagras separat vid -30 till -15°C. För att förhindra möjlig kontaminering och upprepade temperaturförändringar, ska primermixen alikvoteras. Komponenterna får inte användas efter utgångsdatumet.

Hantering

- OvarianSelect-kulor innehåller natriumazid som konserveringsmedel. Natriumazid är cytotoxiskt och måste därför avlägsnas innan kulorna används. (Se "Protokoll: Anrikning av tumörceller med AdnaTest OvarianCancerSelect", sida 14.)
- Alla komponenter och övriga reagenser som kommer från andra leverantörer måste förvaras enligt sina respektive anvisningar. Säkerhetsinformationen från de respektive tillverkarna ska följas.
- Använd skyddshandskar för att undvika kontaminering med DNA, RNA och RNase.
- Alikvotera OvarianSelect-kulorna för att undvika kontaminering.
- Testet måste utföras i den angivna ordningen och måste uppfylla alla angivna specifikationer avseende inkuberingstider och inkuberingstemperaturer.
- Kassera proverna om kulorna agglutinerar under cellanrikningen.
- Utför om möjligt provbearbetning inkl. omvänd transkription och efterföljande analys av amplifierade PCR-produkter i separata rum för att undvika korskontaminering.
- Användning av produkter från andra leverantörer än de som vi rekommenderar kan orsaka undermåliga resultat.
- Upprätthåll säkerhets- och hygienreglerna i labbet (dvs. användning av labbrock, skyddsglasögon och handskar).

Förvaring och hantering av prover

Provberedning

- Blodproverna måste tas innan de terapeutiska substanserna börjar användas. Använd inte AdnaTest OvarianCancerSelect tidigare än 7 dagar efter den senaste terapeutiska åtgärden!
- Blodprovtagning: Om provtransporten är kortare än 4 timmar, ska du använda rör som innehåller EDTA som antikoagulant (t.ex. S Monovette® K3 EDTA, Sarstedt [kat. nr. 01.1605.001]) för att dra minst 7,5 ml helblod.
- Om provtransporten är längre än 4 timmar, ska du använda BD Vacutainer ACD-A-rör (Becton Dickinson GmbH, kat. nr. 366645 [EU]; 364606 [US]) för att dra minst 8,5 ml helblod. Innan vidare bearbetning med AdnaTest, måste 5 ml ACD-A blod överföras till ett AdnaTube, kat. nr. 399932.
- Blodet måste omedelbart förvaras i 4°C.
- Proverna ska bearbetas så fort som möjligt och senast 4 timmar efter blodprovstagningen om standard-EDTA-rör används, eller inom 30 timmar vid användning av BD Vacutainer-blodprovtagningsrör i kombination med AdnaTubes.
- Blodprovet får inte hemolyseras.

Protokoll: Anrikning av tumörceller med AdnaTest OvarianCancerSelect

Viktigt att tänka på före start

- Innan du startar proceduren, bör du läsa "Varningar och försiktighet" (sida 11), "Förvaring och hantering av reagenser" (sida 11) och "Förvaring och hantering av prover" (sida 13).
- OvarianSelect-kulorna måste tvättas innan användning för att avlägsna natriumaziden, som det beskrivs nedan i "Procedur A: Förberedelse av OvarianSelect-kulorna".
- Använd enbart de medföljande 1,5 ml insamlingsrören för de protokollsteg som indikeras.

Åtgärder som ska utföras före start

- Se till att AdnaTest lyserings-/bindningsbufferten ekvilibreras till rumstemperatur. Om du observerar fällningar, ekvilibrerar du reagenserna till rumstemperatur och blandar dem sedan tills de är helt upplösta.

Procedur A: Förberedelse av OvarianSelect-kulorna

1. Resuspendera OvarianSelect-kulorna noggrant genom att pipettera; vortexa inte!
2. Beräkna den volym OvarianSelect-kulor som krävs för samtliga prover som ska bearbetas (100 µl per prov) och överför den beräknade volymen till ett 1,5 ml-reaktionsrör (medföljer inte).

Om mer än 10 prover ska bearbetas använder du fler 1,5 ml-reaktionsrör.

3. Placera röret i AdnaMag-S.
4. Avlägsna supernatanten med en pipett efter 1 minut.

Obs: Rör inte kulorna när du avlägsnar supernatanterna!

5. Tvättsteg:
 - 5a. Ta ut magnetinsatsen från AdnaMag-S.
 - 5b. Tillsätt 1 ml PBS och resuspendera kulorna genom att pipettera upprepade gånger.
 - 5c. Sätt tillbaka magnetinsatsen i AdnaMag-S.
 - 5d. Avlägsna fullständigt supernatanten med en pipett efter 1 minut.
 - 5e. Upprepa stegen 5a till 5d två gånger (totalt tre tvättar).
6. Ta bort röret från AdnaMag-S och resuspendera kulorna i PBS till den ursprungliga volymen (100 µl per prov). Fortsätt med "Procedur B: Välja tumörceller", nedan.

Procedur B: Välja tumörceller

1. Vid användning av standard-EDTA-rör, pipetterar du 5 ml av ett blodprov till ett 15 ml insamlingsrör (medföljer).
Vid användning av ACD-A-blod i ett BD Vacutainer ACD-A-rör, överför du 5 ml blod till ett AdnaTube.
Obs: AdnaTubes är obligatoriska vid användning av BD Vacutainer ACD-A-rör.
2. Resuspendera OvarianSelect-kulorna noggrant (förberedda från steg 6 av procedur A) genom pipettering och tillsätt 100 µl av kulorna till varje blodprov.
3. Roterar rören långsamt (cirka 5 rpm) i 30 minuter vid rumstemperatur med en apparat som både kan luta och rotera.
4. Placera rören i AdnaMag-L utan magnetinsatsen. Vrid AdnaMag-L nedåt för att lossa bloddroppar som fastnat under locket.
5. Sätt in magnetinsatsen och inkubera rören i AdnaMag-L i 3 minuter vid rumstemperatur.
6. Avlägsna all blodsupernatant med hjälp av en 10 ml-pipett utan att röra kulorna.
Obs: Rör inte kulorna när du avlägsnar supernatanterna!

7. Tvättsteg:
 - 7a. Ta ut magnetinsatsen från AdnaMag-L.
 - 7b. Tillsätt 5 ml PBS Stäng rören och skaka försiktigt AdnaMag-L fram och tillbaka 5 gånger för att resuspendera de magnetiska kul/cell-komplexen.
 - 7c. Vrid AdnaMag-L med rören nedåt två gånger för att lossa bloddroppar som fastnat under locket.
 - 7d. Sätt in magnetinsatsen i AdnaMag-L och inkubera i 1 min vid rumstemperatur.
 - 7e. Avlägsna all supernatant med en pipett.
 - 7f. Upprepa stegen 7a till 7e två gånger (totalt tre tvättar).
8. Ta ut magnetinsatsen från AdnaMag-L.
9. Resuspendera de magnetiska kul/cell-komplexen i 1 ml PBS och överför varje prov till ett 1,5 ml-reaktionsrör (medföljer inte).
10. Placera reaktionsrören i AdnaMag-S med insatt magnetinsats.

Obs: Magnetinsatsen till AdnaMag-S kan sättas in i två positioner. Sätt alltid in magnetinsatsen så att den vita plastfilmen pekar framåt för att säkerställa att magneterna är bredvid reaktionsrören.
11. Avlägsna all supernatant efter 1 minut för att optimera den efterföljande cellyseringen.
12. Ta ut magnetinsatsen från AdnaMag-S.
13. Tillsätt 200 µl AdnaTest lyserings-/bindningsbuffert (ekvilibrerad till rumstemperatur) i varje reaktionsrör. Resuspendera genom att pipettera minst fem gånger.
14. Sätt in magnetinsatsen i AdnaMag-S och inkubera i 1 minut.
15. Överför supernatanterna (cellysaten) till nya 1,5 ml-reaktionsrör.
16. Kassera rören med kulorna.
17. Fortsätt med mRNA-isoleringen (se "Protokoll: Detektion av äggstockscancer-associerat genuttryck i anrikade tumörceller med hjälp av AdnaTest OvarianCancerDetect", sida 17) omedelbart, eller lagra cellysaterna vid -20°C i högst 2 veckor.

Protokoll: Detektion av äggstockscancer-associerat genuttryck i anrikade tumörceller med hjälp av AdnaTest OvarianCancerDetect

Viktigt att tänka på före start

- Innan du startar proceduren, bör du läsa "Varningar och försiktighet" (sida 11) och "Förvaring och hantering av reagenser" (sida 11).
- Proceduren A till C beskriver isolering av mRNA och omvänd transkription.
- Använd enbart de medföljande 1,5 ml insamlingsrören för de protokollsteg som indikeras.

Åtgärder som ska utföras före start

- Se till att AdnaTest lyserings-/bindningsbufferten ekvilibreras till rumstemperatur. Om du observerar fällningar, ekvilibreras du reagenserna till rumstemperatur och blandar dem sedan tills de är helt upplösta.
- Ekvilibrera RNA-reningsbuffert A och RNA-reningsbuffert B till rumstemperatur. Lägg Tris-HCl-bufferten på is.
- Tina 10x RT-buffert och dNTP:er från Sensiscript RT-kitet i rumstemperatur. Blanda med vortexblandning. Centrifugera kort och lagra på is. Tina RNase-fritt vatten (ingår i Sensiscript RT-kitet).
- Värm upp ett värmeblock eller vattenbad till 50°C.

Procedur A: Förberedelse av Oligo(dT)₂₅-kulor

1. Resuspendera Oligo(dT)₂₅-kulorna noggrant genom att pipettera. Vortexa inte!
2. Beräkna den volym kulor som krävs för samtliga prover som ska bearbetas (20 µl per prov plus 10%) och överför den beräknade volymen till ett RNase-fritt 1,5 ml-reaktionsrör (medföljer inte).

3. Placera röret i AdnaMag-S.

Obs: Magnetinsatsen till AdnaMag-S kan sättas in i två positioner. Sätt alltid in magnetinsatsen så att den vita plastfilmen pekar framåt för att säkerställa att magneterna är bredvid reaktionsrören.

4. Avlägsna supernatanten med en pipett efter 1 minut.

5. Tvättsteg:

5a. Ta ut magnetinsatsen från AdnaMag-S.

5b. Tillsätt den ursprungliga volymen (steg 2, sida 17) AdnaTest lyserings-/bindningsbuffert och resuspendera kulorna genom upprepad pipettering. Resuspendera försiktigt för att undvika skumbildning.

5c. Sätt in magnetinsatsen i AdnaMag-S.

5d. Avlägsna all supernatant efter 1 minut.

5e. Upprepa stegen 5a till 5d en gång (totalt två tvättar).

6. Ta bort röret från AdnaMag-S och resuspendera kulorna i AdnaTest lyserings-/bindningsbufferten till originalvolym (steg 2, sida 17). Fortsätt med "Procedur B: mRNA-isolering".

Procedur B: mRNA-isolering

1. Tillsätt 20 µl Oligo(dT)₂₅-kulor (steg 6, ovan) till varje rör med cellysat (steg 15, sida 16).

2. Roterä rören långsamt (cirka 5 rpm) i 10 minuter vid rumstemperatur med en apparat som både kan luta och rotera.

3. Placera rören i AdnaMag-S utan magnetinsats. Vrid AdnaMag-S nedåt för att lossa kulor och vätska som fastnat under locket.

4. Sätt in magnetinsatsen och avlägsna supernatanten efter 1 minut.

5. Tvättsteg 1:

- 5a. Ta ut magnetinsatsen från AdnaMag-S.
- 5b. Tillsätt 100 µl RNA-reningsbuffert A i varje rör och resuspendera kulorna genom upprepad pipettering. Skölj locket och rörväggarna noggrant för att undvika förlust av kulor.
- 5c. Sätt in magnetinsatsen i AdnaMag-S.
- 5d. Avlägsna all supernatant efter 1 minut.
- 5e. Upprepa stegen 5a till 5d en gång (totalt två tvättar).

6. Tvättsteg 2:

- 6a. Ta ut magnetinsatsen från AdnaMag-S.
- 6b. Tillsätt 100 µl RNA-reningsbuffert B till varje rör. Resuspendera kulorna via pipettering och överför till nya 1,5 ml reaktionsrör (medföljer).
- 6c. Sätt in magnetinsatsen i AdnaMag-S.
- 6d. Avlägsna all supernatant efter 1 minut. Det här steget måste utföras noggrant (observera pelleten) eftersom kulorna kan glida och tas bort av misstag.
- 6e. Upprepa stegen 6a till 6d en gång i samma reaktionsrör (totalt två tvättar).

7. Ta ut magnetinsatsen från AdnaMag-S.

8. Tillsätt 100 µl iskall Tris-HCl-buffert i varje rör och resuspendera kulorna genom att pipettera.

9. Sätt in magnetinsatsen i AdnaMag-S.

10. Avlägsna all supernatant efter 1 minut.

11. Ta ut magnetinsatsen från AdnaMag-S.

12. Resuspendera mRNA/kul-komplexet i 29,5 µl RNase-fritt vatten.

13. Överför rören till ett värmeblock eller ett vattenbad och inkubera i 5 minuter vid 50°C.

14. Placera rören på is omedelbart i minst 2 minuter.

15. Fortsätt omedelbart (inom 5 minuter) med omvänd transkription (Procedur C: Omvänd transkription med Sensiscript RT-kitet).

Spara inte mRNA/kul-komplexet!

Procedur C: Omvänd transkription med Sensiscript RT-kitet

1. Bered RT-huvudmix på is. RT-huvudmixen bereds enligt beskrivningen i tabell 1 i en mängd som motsvarar antalet prover.

Volymen med RT-huvudmix ska vara 10% större än vad som är beräknat för det totala antalet reaktioner med omvänd transkription. En negativ kontroll-reaktion utan tillsats av mRNA måste alltid beredas (RT-kontroll).

2. Vortexblanda RT-huvudmixen. Centrifugera kort och pipettera 10,5 µl för varje reaktion i 0,2 ml-PCR-rör.
3. Resuspendera mRNA/kul-komplexen (steg 10, sida 19) noggrant med en pipett. Överför den totala volymen till 0,2 ml-PCR-reaktionsröret som innehåller RT-huvudmixen. Blanda noggrant genom att pipettera upprepade gånger.

Tabell 1. Konfiguration för den omvända transkriptionsreaktionen

Komponent	Volym
RT-huvudmix	
10x RT-buffert	4,0 µl
dNTP-mix (5 mM varje dNTP)	4,0 µl
RNase-hämmare, 40 U/µl (Promega)	0,5 µl
Sensiscript omvänt transkriptas	2,0 µl
Mall-RNA*	29,5 µl
mRNA/kul-komplex eller RNase-fritt vatten	
Total volym	40,0 µl

* Tillsätt 29,5 µl RNase-fritt vatten som RT-kontroll istället för mRNA/kul-komplex. Volymen på mRNA/kul-komplexet kan variera något. Använd alltid totalvolymen av detta i den omvända transkriptionsreaktionen.

4. cDNA syntetiseras i en termocykler under följande omständigheter (tabell 2).

Tabell 2. Omvänt transkriptionsprogram

Steg	Tid	Temperatur
Omvänd transkription	60 minuter	37°C
Denaturering	5 minuter	93°C
Nedkylning	∞	4°C

5. Placera reaktionsrören med cDNA på is eller förvara vid max. -20 °C i max. 4 veckor.

6. Fortsätt med "Protokoll: Multiplex och Duplex PCR", sida 22.

Protokoll: Multiplex och Duplex PCR

Viktigt moment före start

- Innan du startar proceduren, bör du läsa "Varningar och försiktighet" (sida 11) och "Förvaring och hantering av reagenser" (sida 11).

Åtgärder som ska utföras före start

- Tina HotStarTaq-huvudmixen (QIAGEN), AdnaTest PrimerMix OvarianDetect, AdnaTest PrimerMix ERCC1-Detect, AdnaTest Positive Control Ovarian, AdnaTest Positive Control ERCC1 och RNase-fritt vatten. Vortexblanda, centrifugera kort och lagra på is.

Procedur A: Multiplex PCR (AdnaTest OvarianDetect)

1. PCR-huvudmixen bereds enligt beskrivningen i tabell 3 i en mängd som motsvarar antalet prover.

Volymen PCR-huvudmix ska vara minst 10% större än vad som beräknas krävas för det aktuella antalet prover. Observera att en AdnaTest Positive Control Ovarian, RNase-fritt vatten som negativ kontroll och RT-kontrollen alltid måste ingå.

2. Fördela 42,0 µl PCR-huvudmix i 0,2 ml-PCR-reaktionsrör för varje beredning. Resuspendera cDNA/kul-mixen genom att pipettera och tillsätta 8,0 µl av den i varje reaktionsrör.

Obs: Tillsätt 8,0 µl RNase-fritt vatten som negativ kontroll istället för cDNA.

Tabell 3. Förberedelse av Multiplex PCR

Komponent	Volym
Multiplex PCR-huvudmix	
HotStarTaq-huvudmix	25,0 µl
RNase-fritt vatten	13,0 µl
AdnaTest PrimerMix ProstateDetect	4,0 µl
cDNA eller RT-kontroll eller Negativ kontroll (RNase-fritt vatten) eller AdnaTest Positive Control Ovarian, vardera:	8,0 µl
Total volym	50,0 µl

3. En termocycler används för PCR enligt programmet som beskrivs i tabell 4. Kör termocyklern med en ökning på 2°C/sekund. PCR utförs med totalt 37 cykler.

Tabell 4. PCR-cyklingsprogram

Steg	Tid	Temperatur
Initialt aktiveringssteg	15 minuter	95°C
3-stegscyklning		
Denaturering	30 sekunder	94°C
Hybridisering	30 sekunder	58°C
Extension	30 sekunder	72°C
Slutlig extension	10 minuter	72°C
Nedkylning	∞	12°C

Procedur B: Duplex-PCR (AdnaTest ERCC1-Detect)

1. PCR-huvudmixen bereds enligt beskrivningen i tabell 5 i en mängd som motsvarar antalet prover.

Volymen huvudmix ska vara minst 10% större än vad som beräknas krävas för det aktuella antalet prover. Observera att en AdnaTest Positive Control ERCC1, RNase-fritt vatten som negativ kontroll och RT-kontrollen alltid måste ingå.

2. Fördela 42,0 µl huvudmix i 0,2 ml-PCR-reaktionsrör för varje beredning. Resuspendera cDNA/kul-mixen genom att pipettera och tillsätta 8,0 µl av den i varje reaktionsrör.

Obs: Tillsätt 8,0 µl RNase-fritt vatten som negativ kontroll istället för cDNA.

Tabell 5. Förberedelse av Duplex-PCR

Komponent	Volym
Duplex PCR-huvudmix	
HotStarTaq-huvudmix	25,0 µl
RNase-fritt vatten	13,0 µl
AdnaTest PrimerMix ERCC1-Detect	4,0 µl
cDNA eller RT-kontroll eller Negativ kontroll (RNase-fritt vatten) eller AdnaTest Positive Control ERCC1, vardera:	8,0 µl
Total volym	50,0 µl

3. En termocykler används för PCR enligt programmet som beskrivs i tabell 6. Kör termocyklern med en ökning på 2°C/sekund. PCR utförs med totalt 35 cykler.

Tabell 6. PCR-cyklingsprogram

Steg	Tid	Temperatur
Initialt aktiveringssteg	15 minuter	95°C
3-stegscyklning		
Denaturering	30 sekunder	94°C
Hybridisering	30 sekunder	60°C
Extension	60 sekunder	72°C
Slutlig extension	10 minuter	72°C
Nedkylning	∞	12°C

Tolkning av resultat

Fragmentanalys på Agilent 2100 Bioanalyzer

Analysen utförs med Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) på ett DNA 1000 LabChip®. Följ instruktionerna i handboken till DNA 1000 LabChip och säkerställ att inga kulor överförs till LabChip. Magnetiska kulor i gelen kan orsaka felaktiga resultat.

1. Starta Bioanalyzer-programmet "2100 expert". Välj **Instrument** under **Contexts (Kontexter)** och klicka sedan på **Assay (Analys)**-knappen bredvid **Assay Selection (Analysval)**.
2. Välj **Electrophoresis (Elektrofores) > DNA 1000 Series II.xsy**. Förbered chipet och starta körningen.
3. Ställ in en detektionströskel för utvärdering av resultaten:
 - 3a. Välj **Data** under **Contexts (Kontexter)** och klicka sedan på fliken **Assay Properties (Analysegenskaper)**. Från listmenyn till höger så väljer du **Global** och **Normal**.
 - 3b. Välj **Sample Setpoints (Provincinställningsvärden) > Integrator (Integrerare) > height threshold (FU) (höjdröskelvärdet (FU))** och ställ in det här värdet till **0** (standardvärdet är **20**) för att identifiera alla signaler.

Analys av resultaten för AdnaTest OvarianDetect

Testet anses vara positivt om ett PCR-fragment från minst ett tumörassocierat transkript (GA733-2, Muc-1 eller CA125) kan detekteras tydligt.

Med hjälp av Agilent 2100 Bioanalyzer, är toppar med en koncentration på ≥ 0.15 ng/ μ l positiva (Figur 3).

Fragmentet för kontrollgenens aktin måste detekteras i alla testprover (intern PCR-kontroll). En aktinsignal fungerar som en positiv kontroll för en framgångsrik cellseparering, omvänd

transkription och multiplex-PCR. Negativ kontroll- och RT-kontrollprover får inte uppvisa band som är större än 80 baspar (primerer-dimerer).

Ett fragment som är större än 1000 bp indikerar kontamination med genomiskt DNA, vilket är en indikation på problem vid cellsepareringen. Resultaten är ogiltiga i detta fall.

VIKTIGT: Om protokollet inte följs till punkt och pricka så kan det resultera i falska-negativa eller falska-positiva resultat.

Kontakta vårt supportteam om du behöver hjälp med att tolka resultaten.

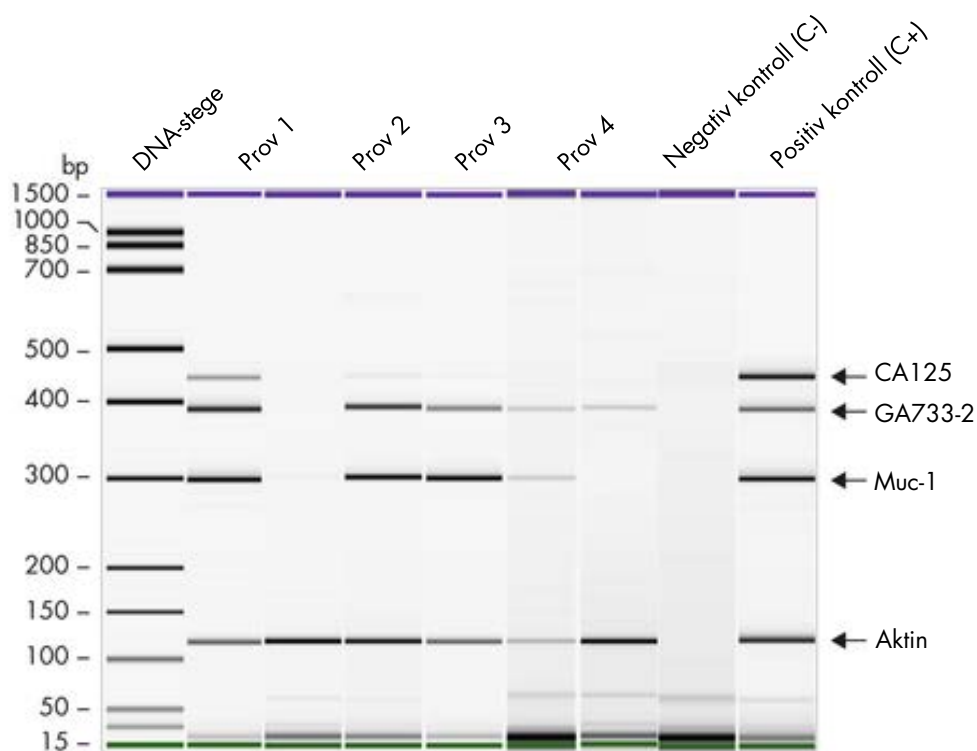


Bild 3. AdnaTest OvarianCancerDetect-resultat från multiplex PCR-prover som analyserats med Agilent 2100 Bioanalyser. I den första raden visas standarden för DNA-storlek (DNA-stege). Prov 1 är positivt för GA733-2, Muc-1 och CA125, prov 3, 4 och 5 är positiva för GA733-2 och Muc-1 och prov 6 är positivt för GA733-2. Prov 2 är negativt. Aktin detekteras i prov 1 till 6. Den PCR-negativa och positiva kontrollen visas i de två sista raderna.

Analys av resultaten för AdnaTest ERCC1-Detect

Med hjälp av Agilent 2100 Bioanalyser, är toppar med en koncentration på $\geq 0,2$ ng/ μ l för ERCC1 positiva (Figur 4).

Fragmentet för kontrollgenens aktin måste detekteras i alla testprover (intern PCR-kontroll). En aktinsignal fungerar som en positiv kontroll för en framgångsrik cellseparering, omvänd transkription och duplex-PCR. Negativ kontroll- och RT-kontrollprover får inte uppvisa band som är större än 80 baspar (primerer-dimerer).

VIKTIGT: Om protokollet inte följs till punkt och pricka så kan det resultera i falska-negativa eller falska-positiva resultat.

Kontakta vårt supportteam om du behöver hjälp med att tolka resultaten.

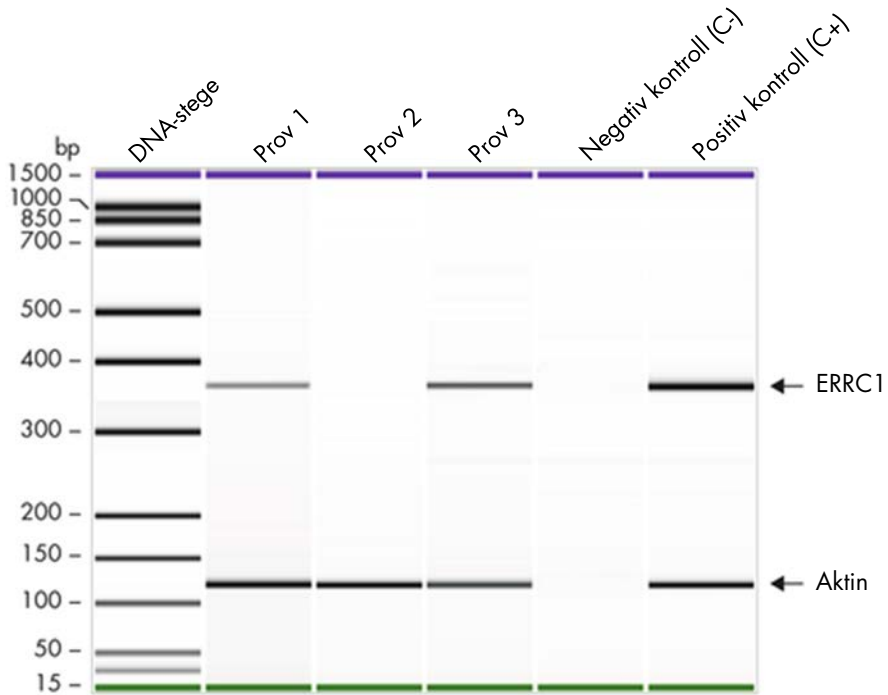


Bild 4. AdnaTest OvarianCancerDetect-resultat för duplex PCR-prover. I den första raden visas standarden för DNA-storlek (DNA-stege). Prov 1 och 3 är positiva för ERCC1. Prov 2 är negativt. Aktin detekteras i prov 1 till 3. Den PCR-negativa och positiva kontrollen (ERCC1) visas i de två sista raderna.

Felsökningshandbok

Besök sidan "Frequently Asked Questions" (Vanliga frågor) på vårt tekniska supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Dessutom svarar teamet för QIAGEN:s tekniska service gärna på frågor om informationen och/eller protokollen i denna handbok eller prov- och analysmetoder (för kontaktinformation, besök www.qiagen.com).

Kvalitetskontroll

I enlighet med QIAGEN:s ISO-certifierade kvalitetshanteringssystem testas varje lot av AdnaTest OvarianCancerSelect och AdnaTest OvarianCancerDetect mot förutbestämda specifikationer för att garantera enhetlig produktkvalitet.

Begränsningar

Alla reagenser får användas uteslutande i in vitro-diagnostik.

Produkten ska endast användas av personal som har fått specialinstruktioner och som har utbildats i in vitro-diagnostiska procedurer.

Det är viktigt att användaren läser bruksanvisningen noga innan användning av systemet.

Bruksanvisningen måste följas strikt för optimala resultat för PCR.

Kontrollera de förfalldatum som anges på förpackningen och på etiketterna till alla komponenter. Använd inte komponenter efter deras förfalldatum.

Eventuella diagnostiska resultat som erhålls måste tolkas tillsammans med övriga kliniska eller laboratoriefynd.

Prestandaegenskaper

Utbyte

Två respektive 5 odlade Igrov1-äggstockscancerceller spikades i blodprover från friska personer för att fastställa utbytesgraderna som erhållits med AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect (tabell 7).

Tabell 7. Utbytesgrad med AdnaTest OvarianCancer för tumörceller som spikats i blodprover från friska personer

	Totalt antal prover	Antal positiva	Utbyte
Två tumörceller spikade i 5 ml blod	20	18	90%
Fem tumörceller spikade i 5 ml blod	20	20	100%

Utbytesgraden är 90 % för detektion av 2 tumörceller spikade i 5 ml blod från friska personer. Detektionen av 5 celler spikade i 5 ml blod från friska personer är 100 %.

Specificitet

AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect användes för att analysera 20 friska personer för att fastställa andelen falskt positiva resultat vid det givna cutoff-värdet (0,15 ng/µl fragmentkoncentration för varje testad gen, utom för aktin). AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect visade en specificitet på 95 % (tabell 8).

Tabell 8. Bestämning av specifikation

Kontroller	Totalt antal prover	Antal falska positiva	Specificitet (%)
Friska blodgivare	20	1 (5%)	95

Reproducerbarhet

Tjugo blodprover från friska personer spikades med 10 Igrov1-äggstockscancer celler per prov. Blodproverna analyserades av två operatörer med hjälp av AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect för att bestämma reproducerbarheten. Reproducerbarheten inom analysen och mellan analyser var 100 % (tabell 9).

Tabell 9. Reproducerbarhet för AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect

Operatör	Positiva AdnaTest-resultat/-prover	Reproducerbarhet inom analysen (%)	Reproducerbarhet mellan analyser (%)
A	10/10	100	100
B	10/10	100	100

Precision

För att fastställa precisionen poolades alikvoter av cDNA och analyserades med hjälp av AdnaTest OvarianCancerDetect. Två operatörer analyserade 30 cDNA-prover, bestående av 3 oberoende mätningar av 10 prover. Precisionen inom analysen och mellan analyser var 100 % (tabell 10).

Tabell 10. Precision för AdnaTest OvarianCancerDetect

Operatör	Positiva AdnaTest-resultat/-prover	Reproducerbarhet inom analysen (%)	Reproducerbarhet mellan analyser (%)
A	30/30	100	100
B	30/30	100	100

Interfererande substanser

Antikoagulanter

Antikoagulanter måste användas vid tagning och transport av blod. Heparin och citrat orsakar dock klumpbildning efter tillsats av immunomagnetiska AdnaTest-kulor, vilket kan leda till att testresultat uteblir eller att testresultaten blir felaktiga. EDTA och ACDA (citrat/dextros/adeninlösning A) är dock kompatibla med de immunomagnetiska AdnaTest-kulorna.

Hemolys

Hemolys i blodprover (plasmafraktionen blir röd) beror i de flesta fall på felaktiga transport- eller förvaringsförhållanden. Sådana prover kan ge falskt negativa resultat och ska kasseras.

Kemoterapeutika, målinriktade läkemedel och antihormonella behandlingar

Kemoterapeutika (taxaner, cisplatin, oxaliplatin, 5-FU, antracyklin, irinotecan etc.) är starka cytotoxiner och orsakar skada eller snabb celledöd i ett blodprov. Detta resulterar i en hög sannolikhet för falskt negativa resultat vid användning av immunomagnetiska AdnaTest-kulor. Efter tillförsel av de här substanserna, behöver människokroppen ungefär 5-7 dagar för avgiftning (tabell 11). Blodprover som tas under den här tiden får inte användas med immunomagnetiska AdnaTest-kulor.

Tabell 11. Halveringstid för kemoterapeutika

Läkemedel	Halveringstid	Referens
5-fluorouracil	Upp till 20 minuter	www.drugs.com/pro/fluorouracil-injection.html
Docetaxel	Upp till 11,1 timmar	www.drugs.com/pro/docetaxel.html
Cis-platinum	Upp till 30 minuter	www.drugs.com/pro/cisplatin.html
Carbo-platinum	Upp till 5,9 timmar	www.drugs.com/pro/carboplatin.html
Paclitaxel	Ungefär 25,4 timmar	www.drugs.com/pro/paclitaxel.html

Samma säkerhetsåtgärd rekommenderas även för målinriktade behandlingar, t.ex. antikroppsbehandlingar (Herceptin[®], bevacizumab, cetuximab etc.), tyrosinkinashämmare (olaparib, Iressa[®], Erbitux[®], lapatinib etc.) och antihormonella läkemedel (tamoxifen, abirateron, enzalutamid etc.) som ges som ett enskilt läkemedel eller i kombination med kemoterapeutika.

I kliniska prövningar som visar det prognostiska värdet av cirkulerande tumörceller (CTC) som identifierats och karakteriserats med hjälp av immunomagnetiska AdnaTest-kulor observerades ingen negativ interferens från kemoterapeutika, målinriktade behandlingar eller antihormonella behandlingar, förutsatt att en väntetid på minst 7 dagar hade passerat sedan läkemedlet tillfördes. En negativ påverkan från vanliga tilläggsbehandlingar (aspirin, ibuprofen, aprepitant, steroider etc.) är osannolik men håller på att undersökas.

Interfererande tillstånd

Koagelbildning

I samband med kliniska prövningar har vi observerat bildning av blodkoagel efter inkubering med immunomagnetiska AdnaTest-kulor – oftast förekommande i blodprover från patienter med sjukdom i ett sent stadium. Blodprover som innehåller koagel är svåra att bearbeta under AdnaTest-arbetsflödet på grund av den ökade viskositeten, och de är svåra att pipettera. De innehåller även ett oacceptabelt högt antal kontaminerande leukocyter, vilket leder till falskt positiva resultat. Sådana prover måste kasseras.

Godartad organisk sjukdom och kroniska inflammatoriska sjukdomar

Godartad organisk sjukdom och kronisk inflammation, till exempel artrit, Crohns sjukdom etc. orsakar inte falskt positiva AdnaTest-resultat.

Akut allergi

Vid akuta allergiska tillstånd finns det ett ökat antal kontaminerande leukocyter efter CTC-anrikning med hjälp av immunomagnetiska AdnaTest-kulor. Därför kan inte falskt positiva resultat uteslutas helt.

Kliniska studier

Resultaten från en klinisk prövning med *AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect* publicerades i *Clinical Chemistry* i oktober 2014. I det här testkitet för äggstockscancer används magnetiska kulor som är märkta med anti-EpCAM och anti-MUC1 för CTC-anrikning, följt av RT-PCR-analys av överexpression av *EpCAM*, *MUC1*, *CA125* och *ERCC1*. I studien var blodprover från 147 patienter tillgängliga vid den primära diagnosen. CTC detekterades hos 14 % av patienterna och förutspådde total överlevnad signifikant (OS: $p = 0,041$). Dessutom hittades ERCC1-positiva CTC hos 8 % av patienterna, vilket korrelerade signifikant med sjukdomsfri överlevnad (DFS: $p = 0,009$) och total överlevnad (OS: $p = 0,026$). Viktigast är att den här studien tydligt visade att ERCC1-positiva CTC är en oberoende prediktor för resistans mot platinumbaserade behandlingar ($p = 0,01$). Förvånansvärt nog hittades den här korrelationen bara för molekylär CTC-karakterisering med AdnaTest, och inte för färgning av IHC-vävnad med hjälp av antikroppen 8F1 som ofta används för ERCC1-detektion i vävnad.

Referens

Kuhlmann, J.D. et al. (2014) ERCC1-Positive Tumor Cells in the Blood of Ovarian Cancer Patients as a Predictive Biomarker for Platinum Resistance. *Clin. Chem.* **60**,1282–9.

Förkortningar

AdnaMag-L	Koncentrator för magnetiska partiklar (-stora)
AdnaMag-S	Koncentrator för magnetiska partiklar (-små)
bp	Baspar
C+	Positiv kontroll
C-	Negativ kontroll
CA125	Cancerantigen 125
cDNA	Komplementär deoxiribonukleinsyra
DNA	Deoxiribonukleinsyra
dNTPs	Deoxinukleotidtrifosfater
ERCC1	Excision repair cross-complementing 1
GA733-2	Gastrointestinal tumörassocierad antigen 733-2
kb	kilobaser
mRNA	Budbärar-ribonukleinsyra
Muc-1	Muc-1-gen
PCR	Polymeraskedjereaktion
RNase	Ribonukleas
rpm	Varv per minut
RT	Omvänd transkription

Symboler



Innehåller tillräckligt med reagenser för <N> test



Används senast



Temperaturbegränsning



Katalognummer



Läs bruksanvisningen innan användning



Tillverkare



In vitro-diagnostisk medicinsk produkt



Materialnummer



GTIN-artikelnummer (Global Trade Item Number)

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
AdnaTest OvarianCancerSelect	För isolering av CTC:er och efterföljande extraktion av mRNA från humant helblod för 12 preparationer	395442
AdnaTest OvarianCancerDetect	RT-PCR Kit för detektion av genuttrycket som är associerat med äggstockscancer i anrikade tumörceller	396442
Relaterade produkter		
AdnaTube	12 provrör innehållandes EDTA. Används enbart med antikoagulerat blod som samlats in med A-CDA-blodprovtagningsrör från BD	399932
AdnaMag-L	För 8 rör, 15 ml	399921
AdnaMag-S	För 8 rör, 1,5 ml	399911
Sensiscript RT Kit (50)	För 50 reaktioner med omvänd transkription: * Sensiscript omvänt transkriptas, 150 µl 10x buffert-RT, 100 µl dNTP-mix (innehåller 5 mM vardera dNTP), 1.1 ml RNase-fritt vatten	205211
HotStarTaq Master Mix Kit (250 U)	3 x 0,85 ml HotStarTaq-huvudmix (innehåller 250 enheter HotStarTaq DNA-polymeras, PCR-buffert med 3 mM MgCl ₂ och 400 µM av varje dNTP) och 2 x 1.7 ml RNase-fritt vatten	203443

* Sensiscript RT Kit (50) räcker endast till 25 prover med AdnaTest OvarianCancerDetect eftersom det krävs dubbel volym för varje reaktion.

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler finns i respektive QIAGEN-kithandbok eller -bruksanvisning. Handböcker och användarmanualer till QIAGEN-kiten finns på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGENS tekniska support eller din lokala distributör.

Begränsat licensavtal för AdnaTest OvarianCancerSelect och AdnaTest OvarianCancerDetect

Användning av den här produkten innebär att köpare eller användare av produkten godkänner följande villkor:

1. Produkten får endast användas i enlighet med de protokoll som medföljer produkten och den här handboken och får endast användas med komponenterna som ingår i kitet. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i detta kit med komponenter som inte ingår i detta kit förutom vad som beskrivs i de protokoll som medföljer produkten, den här handboken och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com. Vissa av de här ytterligare protokollen har tillhandahållits av QIAGEN-användare för andra QIAGEN-användare. De här protokollen har inte testats noggrant eller optimerats av QIAGEN. QIAGEN garanterar inte att de inte kränker tredje parts rättigheter.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att detta kit och/eller dess användning inte kränker oberoende tredje parts rättigheter.
3. Kitet och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. QIAGEN avsäger sig specifikt ansvar för alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, förutom de uttryckligen angivna.
5. Inköparen och användaren av detta kit samtycker till att inte vidta eller tillåta att någon annan vidtar några steg som kan leda till eller underlätta några åtgärder som är förbjudna enligt ovan. QIAGEN kan kräva upphävande av detta begränsade licensavtal i domstol och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, vid eventuell åtgärd för att upprätthålla detta begränsade licensavtal eller någon av företagets immateriella rättigheter avseende kitet och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se www.qiagen.com.

Varumärken: QIAGEN®, Sample to Insight®, HotStarTaq®, Sensiscript® (QIAGEN Group); Agilent® (Agilent Technologies, Inc.); ERBITUX® (ImClone LLC., ett helägt dotterbolag till Eli Lilly and Company); Herceptin® (Genentech, Inc.); IRESSA® (AstraZeneca Group) LabChip® (Caliper Life Sciences, Inc.); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.); Vacutainer® (Becton Dickinson and Company).

HB-2344-001 © 2017 QIAGEN, med ensamrätt.

Beställning www.qiagen.com/shop | Teknisk support support.qiagen.com | Webbplats www.qiagen.com