

März 2017

Handbuch zum AdnaTest ColonCancerSelect und ColonCancerDetect



12 (Katalognummer 395422)



12 (Katalognummer 396422)

Zur Anreicherung von Tumorzellen aus dem Vollblut von Patienten mit Kolonkarzinom und zum Nachweis von Kolonkarzinom-assoziiierter Genexpression in angereicherten Tumorzellen

Für in-vitro-diagnostische Anwendungen

Version 1



395422 (AdnaTest ColonCancerSelect)

396422 (AdnaTest ColonCancerDetect)



QIAGEN GmbH, QIAGEN Straße 1, 40724 Hilden,
DEUTSCHLAND



1106497DE

Sample to Insight



Inhaltsverzeichnis

Verwendungszweck	4
Zusammenfassung und Erläuterung	4
Verfahrensprinzip	5
AdnaTest ColonCancerSelect.....	5
AdnaTest ColonCancerDetect	6
Mitgelieferte Materialien.....	7
Kit-Inhalt.....	7
Erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien	8
AdnaTest ColonCancerSelect.....	9
AdnaTest ColonCancerDetect	9
Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen	10
Sicherheitshinweise.....	10
Informationen zur Anwendung	11
Patente.....	11
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	11
Lagerung.....	11
Handhabung	12
Lagerung und Handhabung der Proben.....	13
Probenvorbereitung	13
Protokoll: Anreicherung von Tumorzellen mit dem AdnaTest ColonCancerSelect.....	14
Protokoll: Nachweis von Kolonkarzinom-assoziiierter Genexpression in angereicherten Tumorzellen mit dem AdnaTest ColonCancerDetect.....	17

Protokoll: Multiplex-PCR.....	22
Interpretation der Ergebnisse.....	24
Fragmentanalyse mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer.....	24
Hilfe zur Fehlerbehebung.....	27
Qualitätskontrolle.....	27
Anwendungseinschränkungen.....	27
Leistungsmerkmale.....	28
Wiederfindung.....	28
Spezifität.....	28
Reproduzierbarkeit.....	29
Präzision.....	29
Störsubstanzen.....	30
Störende Umstände.....	32
Klinische Studien.....	32
Literatur.....	33
Abkürzungen.....	33
Symbole.....	34
Bestellinformationen.....	35

Verwendungszweck

Der AdnaTest ColonCancerSelect ist eine Methode der In-vitro-Diagnostik zur immunochemischen Anreicherung von zirkulierenden Tumorzellen aus antikoagulierten Vollblutproben von Patienten mit Kolonkarzinom über eine Kombination von epithelialen und tumorassoziierten Antigenen.

Der AdnaTest ColonCancerDetect ist ein Test für die In-vitro-Diagnostik zur Analyse der Expressionsprofile von Tumorzellen durch reverse Transkription und Multiplex-PCR mit anschließender densitometrischer Analyse der PCR-Produkte mittels automatisierter Kapillarelektrophorese unter Verwendung des Agilent® 2100 Bioanalyzer.

Der AdnaTest ColonCancerSelect/Detect ist nicht für Screening-Zwecke vorgesehen und darf nicht als diagnostischer Test zur Bestätigung des Vorhandenseins eines Kolonkarzinoms verwendet werden.

Das Produkt darf nur von sachkundigen Personen, z. B. technischen Angestellten und Ärzten, die in der Anwendung molekularbiologischer Techniken geschult sind, verwendet werden.

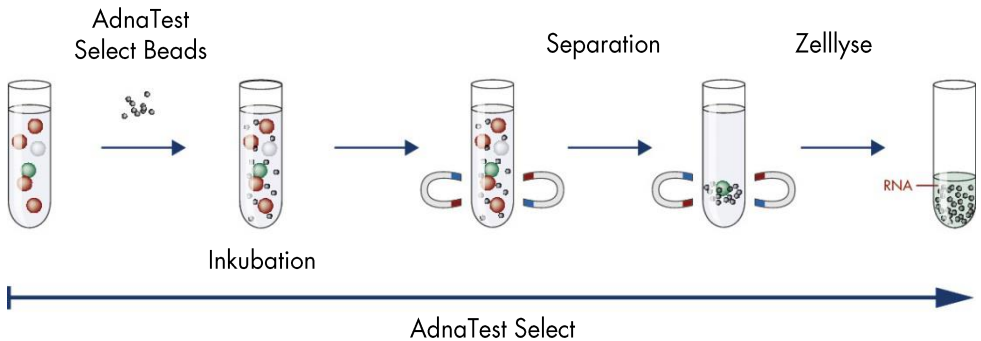
Zusammenfassung und Erläuterung

Der AdnaTest ColonCancerSelect ermöglicht die immunomagnetische Anreicherung von Tumorzellen über epitheliale und tumorassoziierte Antigene. Der AdnaTest ColonCancerDetect dient der Analyse von Kolonkarzinom-assoziiierter Genexpression in immunomagnetisch angereicherten Tumorzellen durch reverse Transkription und PCR.

Verfahrensprinzip

AdnaTest ColonCancerSelect

Antikörper gegen epitheliale und tumorassoziierte Antigene werden zur Markierung von Tumorzellen in Vollblut mit Magnetpartikeln (Beads) konjugiert. Die markierten Zellen werden mit einem Magnetpartikelkonzentrator (AdnaMag-L und AdnaMag-S) extrahiert und anschließend lysiert (Abbildungen 1 und 2).



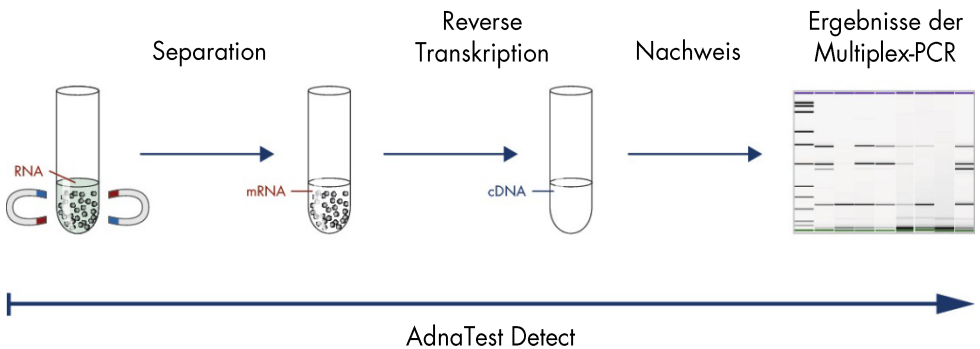
- Blutzellen ● Tumorzellen
- ⊛ Antikörper- oder Oligo (dT)25-beschichtete magnetische Beads

Abbildung 1. AdnaTest ColonCancerSelect: Immunomagnetische Zellselktion mit mehreren tumorassoziierten Antikörpern.

Das Zellysate wird für die weitere Analyse mit dem AdnaTest ColonCancerDetect verwendet.

AdnaTest ColonCancerDetect

Der AdnaTest ColonCancerDetect enthält Oligo (dT)₂₅-Beads zur Isolierung von mRNA aus dem Lysat der zuvor angereicherten Tumorzellen. Nach reverser Transkription wird cDNA erhalten, die anschließend als Vorlage für den Nachweis und die Charakterisierung von Tumorzellen mittels Multiplex-PCR dient. Der AdnaTest PrimerMix ColonDetect ermöglicht die Amplifizierung von drei tumorassoziierten Antigenen und einem Kontrollgen.



● Blutzellen ● Tumorzellen

⊗ Antikörper- oder Oligo (dT)₂₅-beschichtete magnetische Beads

Abbildung 2. AdnaTest ColonCancerDetect: Multiplex-PCR unterschiedlicher krebsassoziierten Tumormarker. In einem zweiten Schritt werden die angereicherten Zellen mittels RT-PCR auf tumorassoziierte Expressionsmuster geprüft. Aus den mRNA-Strängen wird durch reverse Transkription cDNA hergestellt. Anschließend können mehrere assoziierte Tumormarker mittels Multiplex-PCR amplifiziert und visualisiert werden.

Die Primer erzeugen Fragmente von folgender Größe:

- GA733-2: 395 BP
- CEA: 231 BP
- EGFR: 163 BP
- Aktin: 120 BP (interne PCR-Kontrolle)

Hinweis: Die Größe der Fragmente kann leicht variieren. Für die Zuordnung der detektierten Signale ist die AdnaTest Positivkontrolle Colon zu verwenden.

Mitgelieferte Materialien

Kit-Inhalt

AdnaTest ColonCancerSelect			
Katalognummer		395422	
Anzahl Tests		12	
Entnahmeröhrchen	Collection Tubes (1,5 ml) Entnahmeröhrchen (1,5 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	3 x 5
Entnahmeröhrchen	Collection Tubes (15 ml) Entnahmeröhrchen (15 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	24
Rot	ColonSelect Beads	CSB	1,2 ml
Rot	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (Lyse- /Bindungspuffer)	LBB	2 x 1,2 ml
	Handbuch		1

AdnaTest ColonCancerDetect			
Katalognummer	396422		
Anzahl Tests	12		
AdnaTest RNA-Reagenzien			Packung 1
Rot	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (Lyse-/Bindungspuffer)	LBB	2 ml
Orange	Oligo(dT) ₂₅ Beads	OdT	280 µl
Weiß	RNA Purification Buffer A (RNA-Reinigungspuffer A)	BA	4ml
Weiß	RNA Purification Buffer B (RNA-Reinigungspuffer B)	BB	4ml
Lila	Tris-HCL Buffer (Tris-HCL-Puffer)	TB	2 ml
AdnaTest ColonCancerDetect			Packung 2
Blau	AdnaTest PrimerMix ColonDetect	PMC	144 µl
Orange	AdnaTest Positive Control (Positivkontrolle) (C+)	CONTROL +	56 µl
	Handbuch		1

Die Reagenzien des AdnaTest ColonCancerDetect reichen für die Analyse von 6 PCR-Kontrollen und 12 Blutproben.

Erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

AdnaTest ColonCancerSelect

Ausrüstung

- Tube rotator for 15 ml and 1.5 ml tubes (Röhrchenrotator für 15-ml- und 1,5-ml-Röhrchen) (z. B. ELMi Ltd., Kat.-Nr. IMIX-03)
- Magnetpartikel-Konzentratoren
 - AdnaMag-L (Kat.-Nr. 399921)
 - AdnaMag-S (Kat.-Nr. 399911)

Material

- AdnaTube (Kat.-Nr. 399932) für Arbeiten mit BD Vacutainer® ACD-A-Röhrchen
- Sterile, RNase-freie 10-ml-Glas- oder Kunststoffpipetten oder Pipettor
- Sterile, RNase-free 1.5 ml reaction tubes (Sterile, RNase-freie 1,5-ml-Reaktionsröhrchen) (z. B. Sarstedt, Kat.-Nr. 72.690)
- Pipetten und RNase-freie Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere zum Pipettieren von Volumina von 100 µl bis 1000 µl

Reagenzien

- Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.0–7.3 (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,0–7,3) (z. B. Fisher, Kat.-Nr. VX14190169, D-PBS)

AdnaTest ColonCancerDetect

Ausrüstung

- Tube rotator for 1.5 ml tubes (Röhrchenrotator für 1,5-ml-Röhrchen) (z. B. ELMi Ltd., Kat.-Nr. IMIX-03)
- Magnetic particle concentrator AdnaMag-S (Magnetpartikel-Konzentrator AdnaMag-S) (Kat.-Nr. 399911)

- Thermoblock oder Wasserbad (50°C)
- Thermocycler mit heizbarem Deckel und einer Heizrate von 2 °C/s.
- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)

Material

- Sterile, RNase-freie dünnwandige 0,2-ml-PCR-Röhrchen
- Sterile, RNase-freie 1,5-ml-Reaktionsröhrchen (z. B. Sarstedt, Kat.-Nr. 72.690)
- Pipetten und RNase-freie Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere zum Pipettieren von Volumina von 1 µl bis 200 µl

Reagenzien

- Sensiscript® RT Kit (QIAGEN, Kat.-Nr. 205211, 50 Reaktionen)
 - **Hinweis:** Das Sensiscript RT Kit (Kat.-Nr. 205211) reicht nur für 25 Proben, weil für jede Reaktion das doppelte Volumen erforderlich ist.
- Rekombinantes RNasin, RNase-Inhibitor, 2,500 U (Promega, Kat.-Nr. N2511)
- HotStarTaq® Master Mix Kit (QIAGEN, Kat.-Nr. 203443, 250 U)
- Zerstoßenes Eis

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

Für in-vitro-diagnostische Anwendungen

Sicherheitshinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (SDS) entnehmen. Diese sind im praktischen, kompakten PDF-Format online unter www.qiagen.com/safety verfügbar; hier können Sie die Sicherheitsdatenblätter zu allen Kits und Kit-Komponenten von QIAGEN einsehen und ausdrucken.

Proben- und Testabfälle sind gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.

Informationen zur Anwendung

Diese Tests dürfen nur von Fachpersonal, das molekularbiologische Techniken beherrscht, durchgeführt werden.

Patente

Der AdnaTest ColonCancerDetect erfordert Lizenzen der Firma Hoffmann-La Roche AG, Basel. Der Kauf des AdnaTest ColonCancerDetect berechtigt den Nutzer nicht, die PCR ohne Lizenz durchzuführen.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Lagerung

Das System AdnaTest ColonCancer wird in drei Packungen geliefert. Der AdnaTest ColonCancerSelect (Kat.-Nr. 395422) und die AdnaTest RNA Reagent Packung 1 (Packung 1 von Kat.-Nr. 396422) müssen bei 2–8 °C gelagert werden. Die Komponenten dürfen nur bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.

Die AdnaTest ColonCancerDetect Packung 2 (Packung 2 von Kat.-Nr. 396422) mit dem AdnaTest PrimerMix ColonDetect und die AdnaTest Positive Control Colon müssen separat bei

-30 bis -15 °C gelagert werden. Aliquotieren Sie die Primermischung, um mögliche Kontaminationen und wiederholte Temperaturveränderungen zu vermeiden. Die Komponenten dürfen nur bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.

Handhabung

- ColonSelect Beads enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Natriumazid ist zytotoxisch und muss daher vor der Benutzung der Beads entfernt werden. (Siehe „Protokoll: Anreicherung von Tumorzellen mit dem AdnaTest ColonCancerSelect“ auf Seite 14.)
- Alle Komponenten und weiteren Reagenzien anderer Lieferanten sind den jeweiligen Anweisungen entsprechend zu lagern. Es gelten die Sicherheitshinweise des jeweiligen Herstellers.
- Tragen Sie Schutzhandschuhe, um Kontaminationen durch DNA, RNA und RNasen zu vermeiden.
- Aliquotieren Sie die ColonSelect Beads, um eine Kontamination zu vermeiden.
- Bei der Durchführung des Tests müssen die Arbeitsschritte in der angegebenen Reihenfolge durchgeführt und alle angegebenen Spezifikationen in Bezug auf Inkubationszeiten und -temperaturen eingehalten werden.
- Proben, in denen die zur Selektion verwendeten Beads während der Zellanreicherung agglutinieren, sind zu verwerfen.
- Die Probenverarbeitung, einschließlich reverser Transkription und anschließender Analyse der amplifizierten PCR-Produkte, wenn möglich, in unterschiedlichen Räumen durchführen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Die Verwendung von Produkten anderer Hersteller als den hier genannten kann die Ergebnisse beeinträchtigen.
- Die Sicherheits- und Hygienevorschriften des Labors (z. B. das Tragen von Laborkittel, Schutzbrille, Schutzhandschuhen) sind einzuhalten.

Lagerung und Handhabung der Proben

Probenvorbereitung

- Blutproben müssen vor der Anwendung therapeutischer Wirkstoffe entnommen werden. Der AdnaTest ColonCancerSelect darf frühestens 7 Tage nach der letzten therapeutischen Intervention angewendet werden!
- Blutentnahme: Wenn zum Probentransport weniger als 4 Stunden benötigt werden, Röhrchen mit EDTA als Antikoagulans (z. B. S Monovette® K3 EDTA, Sarstedt [Kat.-Nr. 01.1605.001]) verwenden und mindestens 7,5 ml Vollblut entnehmen.
- Wenn zum Probentransport mehr als 4 Stunden benötigt werden, BD Vacutainer ACD-A-Röhrchen (Becton Dickinson GmbH, Kat.-Nr. 366645 [EU]; 364606 [US]) verwenden und mindestens 8,5 ml Vollblut entnehmen. Vor der weiteren Verarbeitung mit dem AdnaTest müssen 5 ml ACD-A-Blut in ein AdnaTube, Kat.-Nr. 399932, überführt werden.
- Blut muss sofort bei 4 °C aufbewahrt werden.
- Proben sind so rasch wie möglich zu verarbeiten, jedoch nicht mehr als 4 Stunden nach der Blutentnahme bei Verwendung von Standard-EDTA-Röhrchen oder innerhalb von 30 Stunden bei Verwendung von BD Vacutainer Blutentnahmeröhrchen in Kombination mit AdnaTubes.
- Die Blutproben dürfen nicht hämolysiert werden.

Protokoll: Anreicherung von Tumorzellen mit dem AdnaTest ColonCancerSelect

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Lesen Sie vor Beginn der Arbeitsschritte die Abschnitte „Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen“ (auf Seite 10), „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ (auf Seite 11) und „Lagerung und Handhabung der Proben“ (auf Seite 13).
- Vor der Verwendung der ColonSelect Beads müssen diese, wie nachfolgend in Abschnitt „Verfahren A: Vorbereitung der ColonSelect Beads“ beschrieben, gewaschen werden, um Natriumazid zu entfernen.
- Verwenden Sie bitte die mitgelieferten 1,5-ml-Entnahmeröhrchen nur für den angegebenen Arbeitsschritt im Protokoll.

Vorbereitende Schritte

- Sicherstellen, dass der AdnaTest Lyse-/Bindungspuffer auf Raumtemperatur erwärmt ist. Falls ein Präzipitat erkennbar ist, die Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmen und mischen, bis das Präzipitat vollständig gelöst ist.

Verfahren A: Vorbereitung der ColonSelect Beads

1. Die ColonSelect Beads durch Pipettieren vollständig resuspendieren; nicht vortexen!
2. Das Volumen der ColonSelect Beads, das für die Verarbeitung aller Proben erforderlich ist (100 µl pro Probe) berechnen und das berechnete Volumen in ein 1,5-ml-Reaktionsröhrchen (nicht mitgeliefert) überführen.

Wenn mehr als 10 Proben verarbeitet werden, zusätzliche 1,5-ml-Reaktionsröhrchen verwenden.

3. Das Röhrchen in den AdnaMag-S stellen.
4. Den Überstand nach 1 Minute mit einer Pipette entfernen.

Hinweis: Bei der Entfernung des Überstandes dürfen die Partikel nicht berührt werden!

5. Waschschritte:

- 5a. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-S herausnehmen.
 - 5b. 1 ml PBS hinzufügen und die Partikel durch wiederholtes Pipettieren resuspendieren.
 - 5c. Den Magnetschieber in den AdnaMag-S einsetzen.
 - 5d. Den Überstand nach 1 Minute vollständig mit einer Pipette entfernen.
 - 5e. Die Schritte 5a bis 5d zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschschritte).
6. Das Röhrchen aus dem AdnaMag-S herausnehmen und die Beads in PBS auf das ursprüngliche Volumen (100 µl pro Probe) resuspendieren. Mit „Verfahren B: Selektion von Tumorzellen“ fortfahren unten.

Verfahren B: Selektion von Tumorzellen

1. Bei Verwendung von Standard-EDTA-Röhrchen 5 ml einer Blutprobe in ein 15-ml-Entnahmeröhrchen (mitgeliefert) pipettieren.
Bei Verwendung von ACD-A-Blut in einem BD Vacutainer ACD-A-Röhrchen 5 ml Blut in ein AdnaTube überführen.

Hinweis: AdnaTubes sind bei Verwendung von BD Vacutainer ACD-A-Röhrchen obligatorisch.

2. Die (in Schritt 6 von Verfahren A vorbereiteten) ColonSelect Beads durch Pipettieren vollständig resuspendieren und jeder Blutprobe 100 µl dieser Beads zusetzen.
3. Die Röhrchen 30 Minuten lang bei Raumtemperatur in einem Gerät, das sowohl Drehen als auch Neigung ermöglicht, langsam (bei etwa 5 rpm) drehen lassen.
4. Die Röhrchen in den AdnaMag-L ohne den Magnetschieber stellen. Durch Abwärtsschwingen des AdnaMag-L am Deckel verbliebene Blutropfen ablösen.
5. Den Magnetschieber einsetzen und die Röhrchen 3 Minuten lang bei Raumtemperatur im AdnaMag-L inkubieren.
6. Den Blutüberstand mit einer 10-ml-Pipette vollständig entfernen, ohne die Beads zu berühren.

Hinweis: Bei der Entfernung des Überstandes dürfen die Partikel nicht berührt werden!

7. Waschschritte:

- 7a. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-L herausnehmen.
 - 7b. 5 ml PBS hinzufügen. Die Röhrchen schließen und den AdnaMag-L 5 Mal vorsichtig hin und her schwenken, um die Magnetpartikel/Zellkomplexe zu resuspendieren.
 - 7c. Den AdnaMag-L mit den Röhrchen abwärtsschwingen, um am Deckel verbliebene Tropfen abzulösen.
 - 7d. Den Magnetschieber in den AdnaMag-L einsetzen und für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubieren.
 - 7e. Den Überstand mit einer Pipette vollständig entfernen.
 - 7f. Die Schritte 7a bis 7e zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschschritte).
8. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-L herausnehmen.
9. Die Magnetpartikel/Zellkomplexe in 1 ml PBS resuspendieren und jede Probe in ein 1,5-ml-Reaktionsröhrchen (nicht mitgeliefert) überführen.
10. Die Reaktionsröhrchen in den AdnaMag-S mit eingeschobenem Magnetschieber stellen.
- Hinweis:** Der Magnetschieber des AdnaMag-S kann in zwei unterschiedlichen Positionen eingesetzt werden. Den Magnetschieber immer mit nach vorn gerichteter weißer Kunststoffolie einsetzen, damit sich die Magnete nahe an den Reaktionsröhrchen befinden.
11. Den Überstand nach 1 Minute vollständig mit einer Pipette entfernen, um die anschließende Zellyse zu optimieren.
12. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-S herausnehmen.
13. Jedem Reaktionsröhrchen 200 µl AdnaTest Lyse-/Bindungspuffer (auf Raumtemperatur erwärmt) zusetzen. Durch mindestens fünfmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendieren.
14. Den Magnetschieber in den AdnaMag-S einsetzen und für 1 Minute inkubieren.
15. Jeden einzelnen Überstand (Zellysate) in ein neues 1,5-ml-Reaktionsröhrchen überführen.
16. Die Röhrchen mit den Beads verwerfen.
17. Umgehend mit der mRNA-Isolierung fortfahren (siehe „Protokoll: Nachweis von Kolonkarzinom-assoziiierter Genexpression in angereicherten Tumorzellen mit dem AdnaTest ColonCancerDetect“, auf Seite 17) oder die Zellysate bei -20 °C nicht länger als 2 Wochen lang lagern.

Protokoll: Nachweis von Kolonkarzinom-assoziierter Genexpression in angereicherten Tumorzellen mit dem AdnaTest ColonCancerDetect

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Lesen Sie vor Beginn der Arbeit die Abschnitte „Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen“ (auf Seite 10) und „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ (auf Seite 11).
- Die Isolierung von mRNA und die reverse Transkription sind in Verfahren A bis C beschrieben.
- Verwenden Sie bitte die mitgelieferten 1,5-ml-Entnahmeröhrchen nur für den angegebenen Arbeitsschritt im Protokoll.

Vorbereitende Schritte

- Sicherstellen, dass der AdnaTest Lyse-/Bindungspuffer auf Raumtemperatur erwärmt ist. Falls ein Präzipitat erkennbar ist, die Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmen und mischen, bis das Präzipitat vollständig gelöst ist.
- RNA-Reinigungspuffer A und RNA-Reinigungspuffer B auf Raumtemperatur erwärmen. Tris-HCL-Puffer auf Eis stellen.
- Den 10x Puffer RT und die dNTPs aus dem Sensiscript RT Kit bei Raumtemperatur auftauen lassen. Auf dem Vortexmischer mischen. Kurz zentrifugieren und auf Eis stellen. RNase-freies Wasser (Bestandteil des Sensiscript RT Kits) auftauen lassen.
- Einen Thermoblock oder ein Wasserbad auf 50 °C vorheizen.

Verfahren A: Vorbereitung der Oligo(dT)₂₅ Beads

1. Die Oligo(dT)₂₅ Beads durch Pipettieren vollständig resuspendieren. Nicht vortexen!
2. Das für die Verarbeitung aller Proben erforderliche Bead-Volumen (20 µl pro Probe plus 10 %) berechnen und das berechnete Volumen in ein RNase-freies 1,5-ml-Reaktionsröhrchen (nicht mitgeliefert) überführen.
3. Das Röhrchen in den AdnaMag-S stellen.
Hinweis: Der Magnetschieber des AdnaMag-S kann in zwei unterschiedlichen Positionen eingesetzt werden. Den Magnetschieber immer mit nach vorn gerichteter weißer Kunststoffolie einsetzen, damit sich die Magnete nahe an den Reaktionsröhrchen befinden.
4. Den Überstand nach 1 Minute mit einer Pipette entfernen.
5. Waschschritte:
 - 5a. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-S herausnehmen.
 - 5b. Das ursprüngliche Volumen (Schritt 2 auf Seite 18) AdnaTest Lyse-/Bindungspuffer hinzufügen und die Beads durch mehrmaliges Pipettieren resuspendieren. Vorsichtig resuspendieren, um Schaumbildung zu vermeiden.
 - 5c. Den Magnetschieber in den AdnaMag-S einsetzen.
 - 5d. Nach 1 Minute den Überstand vollständig entfernen.
 - 5e. Die Schritte 5a bis 5d einmal wiederholen (insgesamt zwei Waschschritte).
6. Das Röhrchen aus dem AdnaMag-S herausnehmen und die Beads in AdnaTest Lyse-/Bindungspuffer auf das ursprüngliche Volumen resuspendieren (Schritt 2 auf Seite 18). Mit „Verfahren B: mRNA-Isolierung“ fortfahren.

Verfahren B: mRNA-Isolierung

1. 20 µl Oligo(dT)₂₅ Beads (Schritt 6, oben) in jedes Röhrchen mit Zelllysat geben (Schritt 15 auf Seite 16).
2. Die Röhrchen 10 Minuten lang bei Raumtemperatur in einem Gerät, das sowohl Drehen als auch Neigung ermöglicht, langsam (bei etwa 5 rpm) drehen lassen.
3. Die Röhrchen in den AdnaMag-S stellen ohne den Magnetschieber stellen. Durch Abwärtsschwingen des AdnaMag-S am Deckel verbliebene Beads und Flüssigkeit ablösen.

4. Den Magnetschieber einsetzen und den Überstand nach 1 Minute entfernen.
5. Waschschritte 1:
 - 5a. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-S herausnehmen.
 - 5b. Jedem Röhrchen 100 µl RNA-Reinigungspuffer A zusetzen und die Beads durch mehrmaliges Pipettieren resuspendieren. Um einen Verlust an Beads zu verhindern, den Deckel und die Röhrchenwand gründlich spülen.
 - 5c. Den Magnetschieber in den AdnaMag-S einsetzen.
 - 5d. Nach 1 Minute den Überstand vollständig entfernen.
 - 5e. Die Schritte 5a bis 5d einmal wiederholen (insgesamt zwei Waschschritte).
6. Waschschritte 2
 - 6a. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-S herausnehmen.
 - 6b. Jedem Röhrchen 100 µl RNA-Reinigungspuffer B zusetzen. Die Beads durch Pipettieren resuspendieren und in ein neues 1,5-ml-Reaktionsröhrchen (mitgeliefert) überführen.
 - 6c. Den Magnetschieber in den AdnaMag-S einsetzen.
 - 6d. Nach 1 Minute den Überstand vollständig entfernen. Bei diesem Schritt ist Vorsicht geboten (das Pellet im Auge behalten), da die Beads abrutschen und versehentlich mit entfernt werden können.
 - 6e. Die Schritte 6a bis 6d in denselben Reaktionsröhrchen einmal wiederholen (insgesamt zwei Waschschritte).
7. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-S herausnehmen.
8. Jedem Röhrchen 100 µl eiskalten Tris-HCL-Puffer zusetzen und die Beads durch Pipettieren resuspendieren.
9. Den Magnetschieber in den AdnaMag-S einsetzen.
10. Nach 1 Minute den Überstand vollständig entfernen.
11. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-S herausnehmen.
12. Den mRNA/Bead-Komplex in 29,5 µl RNase-freiem Wasser resuspendieren.
13. Die Röhrchen in einen Thermoblock oder in ein Wasserbad überführen und 5 Minuten lang bei 50 °C inkubieren.
14. Die Röhrchen sofort mindestens 2 Minuten lang auf Eis stellen.

15. Umgehend (innerhalb von 5 Minuten) mit der reversen Transkription fortfahren (Verfahren C: Reverse Transkription mit dem Sensiscript RT Kit).

Der mRNA/Bead-Komplex darf nicht gelagert werden!

Verfahren C: Reverse Transkription mit dem Sensiscript RT Kit

1. Den RT Master Mix auf Eis vorbereiten. Die Herstellung des RT Master Mix für die entsprechende Anzahl an Proben erfolgt gemäß Tabelle 1.

Das Volumen des RT Master Mix sollte 10 % größer als das Volumen sein, das für die Gesamtzahl der Reaktionen mit reverser Transkription berechnet wurde. Es muss stets ein Reaktionsansatz ohne Zugabe von mRNA als Negativkontrolle (RT-Kontrolle) vorbereitet werden.

2. Den RT Master Mix vortexen. Kurz zentrifugieren und 10,5 µl pro Reaktion in 0,2-ml-PCR-Röhrchen pipettieren.

3. Die mRNA/Bead-Komplexe (Schritt 10 auf Seite 19) vorsichtig mit einer Pipette resuspendieren. Das gesamte Volumen in das 0,2-ml-PCR-Reaktionsröhrchen mit dem RT Master Mix überführen. Durch wiederholtes Pipettieren gründlich mischen.

Tabelle 1. Reverse Transkription – Reaktionsschema

Komponente	Volumen
RT Master Mix	
10x Puffer RT	4,0 µl
dNTP Mix (jeweils 5 mM dNTP)	4,0 µl
RNase-Inhibitor, 40 U/µl (Promega)	0,5 µl
Sensiscript Reverse Transkriptase	2,0 µl
RNA-Vorlage*	29,5 µl
mRNA/Bead-Komplex oder RNase-freies Wasser	
Gesamtvolumen	40,0 µl

* Als RT-Kontrolle 29,5 µl RNase-freies Wasser anstelle des mRNA/Bead-Komplexes hinzufügen. Das Volumen des mRNA/Bead-Komplexes kann leicht variieren. Verwenden Sie stets das gesamte Volumen für die Reverse-Transkription-Reaktion.

4. Die cDNA-Synthese erfolgt in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen (Tabelle 2).

Tabelle 2. Reverse Transkription – Programm

Schritt	Dauer	Temperatur
Reverse Transkription	60 Minuten	37 °C
Denaturierung	5 Minuten	93 °C
Abkühlung	∞	4 °C

5. Die Reaktionsröhrchen mit der cDNA auf Eis stellen oder maximal 4 Wochen lang bei -20 °C lagern.

6. Mit „Protokoll: Multiplex-PCR“ auf Seite 22 fortfahren.

Protokoll: Multiplex-PCR

Wichtiger Hinweis, der vor der Durchführung zu beachten ist

- Lesen Sie vor Beginn der Arbeit die Abschnitte „Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen“ (auf Seite 10) und „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ (auf Seite 11).

Vorbereitende Schritte

- HotStarTaq Master Mix (QIAGEN), AdnaTest Positivkontrolle Colon, AdnaTest PrimerMix ColonDetect und RNase-freies Wasser auftauen. Vortexen, kurz zentrifugieren und auf Eis stellen.

Verfahren

1. Die Herstellung des PCR Master Mix für die entsprechende Anzahl an Proben erfolgt gemäß Tabelle 3.

Das Volumen des PCR Master Mix sollte mindestens 10 % größer sein als das berechnete, für die Probenzahl erforderliche Volumen. Es müssen stets eine AdnaTest Positivkontrolle Colon, RNase-freies Wasser als Negativkontrolle und die RT-Kontrolle mitgeführt werden.

2. Pro Ansatz 42,0 µl des PCR Master Mix in ein 0,2-ml-PCR-Reaktionsröhrchen pipettieren. Die cDNA/Bead-Mischung durch Pipettieren resuspendieren und 8,0 µl davon in jedes Reaktionsröhrchen geben.

Hinweis: Als Negativkontrolle 8,0 µl RNase-freies Wasser anstelle von cDNA hinzufügen.

Tabelle 3. Vorbereitung der Multiplex-PCR

Komponente	Volumen
Multiplex PCR Master Mix	
HotStarTaq Master Mix	25,0 µl
RNase-freies Wasser	13,0 µl
AdnaTest PrimerMix ColonDetect	4,0 µl
cDNA oder RT-Kontrolle oder Negativkontrolle (RNase-freies Wasser) oder AdnaTest Positivkontrolle Colon, jeweils:	8,0 µl
Gesamtvolumen	50,0 µl

3. Für die PCR wird ein Thermocycler gemäß dem in Tabelle 4 beschriebenen Programm verwendet. Für den Thermocycler eine Heizrate von 2 °C/Sekunde auswählen. Die Durchführung der PCR umfasst insgesamt 38 Zyklen.

Tabelle 4. Programm der PCR-Zyklen

Schritt	Dauer	Temperatur
Anfänglicher Aktivierungsschritt	15 Minuten	95 °C
3-Schritt-Zyklus		
Denaturierung	45 Sekunden	94 °C
Annealing	45 Sekunden	58 °C
Verlängerung	45 Sekunden	72 °C
Abschließende Verlängerung	10 Minuten	72 °C
Abkühlung	∞	4 °C

Interpretation der Ergebnisse

Fragmentanalyse mit dem Agilent 2100 Bioanalytiker

Die Analyse erfolgt mit dem Agilent 2100 Bioanalytiker (Agilent Technologies) auf einem DNA 1000 LabChip®. Befolgen Sie die Anleitungen im Handbuch des DNA 1000 LabChip und stellen Sie sicher, dass keine Beads in den Chip gelangen. Im Gel befindliche Magnetpartikel können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

1. Die Bioanalytiker-Software „2100 expert“ starten. Wählen Sie unter **Contexts Instrument** und klicken Sie auf die Schaltfläche **Assay** neben **Assay Selection**.
2. Wählen Sie **Electrophoresis > DNA 1000 Series II.xsy**. Bereiten Sie den Chip vor und starten Sie den Lauf.
3. Stellen Sie für die Auswertung der Ergebnisse die Detektionsgrenze wie folgt ein:
 - 3a. Wählen Sie unter **Contexts Data** und klicken Sie anschließend auf die Registerkarte **Assay Properties**. Wählen Sie im Drop-down-Menü auf der rechten Seite **Global** und **Normal**.
 - 3b. Wählen Sie **Sample Setpoints > Integrator > height threshold (FU)** und setzen Sie diesen Wert auf **0** (der vorgegebene Wert ist **20**), um alle Signale zu erfassen.

Auswertung der Ergebnisse

Der Test wird positiv gewertet, wenn ein PCR-Fragment mindestens eines Tumor-assoziierten Transkripts eindeutig nachgewiesen wird.

Bei Verwendung des Agilent 2100 Bioanalyser sind Peaks mit einer Konzentration von $\geq 0,10$ ng/ μ l positiv (Abbildung 3).

Das Fragment des Kontrollgens Aktin muss in allen getesteten Proben vorhanden sein (interne PCR-Kontrolle). Ein Aktin-Signal stellt eine Positivkontrolle für eine erfolgreiche Zellseparation, reverse Transkription und Multiplex-PCR dar. Die Negativkontrolle und RT-Kontrollproben dürfen keine Banden enthalten, die größer sind als 80 Basenpaare (Primerdimere).

Ein Fragment mit einer Größe von mehr als 900 BP deutet auf eine Kontamination mit genomischer DNA hin, was auf Probleme bei der Zellseparation hindeutet. In diesem Fall sind die Ergebnisse ungültig.

WICHTIG: Wird das Protokoll nicht ganz genau befolgt, kann dies zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen führen.

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

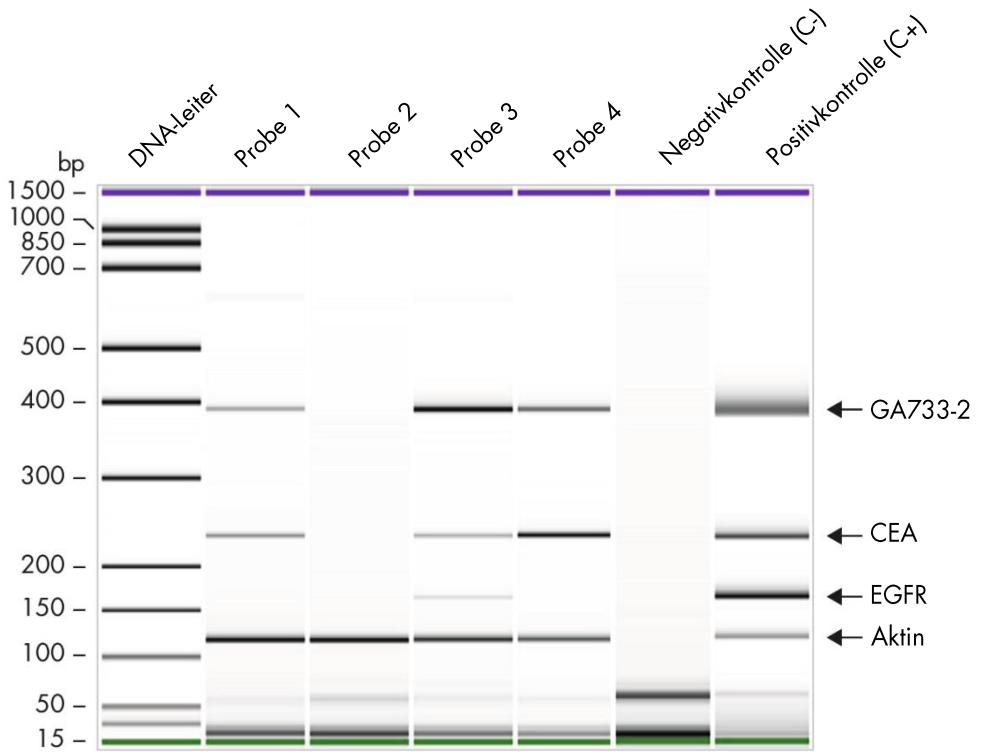


Abbildung 3. Ergebnisse des AdnaTest ColonCancerDetect für mit dem Agilent 2100 Bioanalyser analysierte Proben. Die erste Spur zeigt den DNA-Größenstandard (DNA-Leiter). Proben 1 und 4 sind positiv auf GA733-2 und CEA; Probe 2 ist negativ und Probe 3 ist positiv auf GA733-2, CEA und EGFR. Aktin ist in den Proben 1 bis 4 nachweisbar. Die PCR-Negativkontrolle (C-) und die Positivkontrolle (C+) sind in den beiden letzten Spuren zu sehen.

Hilfe zur Fehlerbehebung

Informationen dazu finden Sie auf der Seite „Frequently Asked Questions“ unseres technischen Support-Centers unter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Darüber hinaus stehen die Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler beim QIAGEN Technischen Service unterstützend zur Seite, falls Sie Fragen zu den Informationen und/oder Protokollen in diesem Handbuch oder zu den für die Proben und Tests verwendeten Methoden haben sollten (Kontaktinformationen siehe unter www.qiagen.com).

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von QIAGEN wird jede Charge von AdnaTest ColonCancerSelect und AdnaTest ColonCancerDetect nach festgelegten Prüfkriterien kontrolliert, um eine einheitliche Produktqualität sicherzustellen.

Anwendungseinschränkungen

Alle Reagenzien dürfen ausschließlich zur In-vitro-Diagnostik verwendet werden.

Die Anwendung darf nur durch Personal erfolgen, das speziell in In-vitro-Diagnostik-Verfahren unterrichtet und ausgebildet wurde.

Der Bediener muss die Gebrauchsanleitung vor der Anwendung des Systems sorgfältig durchlesen.

Zur Gewährleistung optimaler PCR-Ergebnisse muss die Gebrauchsanleitung genau befolgt werden.

Die Verfallsdaten, die auf den Packungen und Etiketten aller Komponenten aufgedruckt sind, sind zu überprüfen. Die Komponenten dürfen nur bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.

Alle diagnostischen Ergebnisse müssen unter Berücksichtigung vorliegender klinischer und labortechnischer Daten interpretiert werden.

Leistungsmerkmale

Wiederfindung

Blutproben von gesunden Spendern wurden mit zwei und 10 kultivierten T84-Kolonkarzinomzellen versetzt (gespikt), um die mit dem AdnaTest ColonCancerSelect/Detect erzielten Wiederfindungsraten zu ermitteln (Tabelle 5).

Tabelle 5. AdnaTest ColonCancer – Wiederfindungsrate von Tumorzellen, die Blutproben gesunder Spender zugesetzt wurden

	Gesamtzahl der Proben	Anzahl Positivproben	Wiederfindung
Zusatz von zwei Tumorzellen zu 5 ml Blut	63	48	76 %
Zusatz von zehn Tumorzellen zu 5 ml Blut	41	41	100 %

Die Wiederfindungsrate für den Nachweis von 2 Tumorzellen, die 5 ml Blut von gesunden Spendern zugesetzt wurden, beträgt 76 %. Die Wiederfindungsrate für den Nachweis von 10 Zellen, die 5 ml Blut von gesunden Spendern zugesetzt wurden, beträgt 100 %.

Spezifität

Mithilfe des AdnaTest ColonCancerSelect/Detect wurden 106 gesunde Spender analysiert, um die Rate falsch positiver Ergebnisse bei dem vorgegebenen Schwellenwert (Konzentration von 0,15 ng/ μ l Fragment für jedes untersuchte Genprofil, mit Ausnahme von Aktin) zu ermitteln.

Tabelle 6. Bestimmung der Spezifität

Kontrollen	Gesamtzahl der Proben	Anzahl falsch positiver Proben	Spezifität (%)
Gesunde Spender	106	2 (2 %)	98

Der AdnaTest ColonCancerSelect/Detect zeigte eine Spezifität von 98 % (Tabelle 6).

Reproduzierbarkeit

Zwanzig Blutproben von gesunden Spendern wurden mit 10 T84-Kolonkarzinomzellen pro Probe versetzt. Die Blutproben wurden zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit von zwei Bedienern mit dem AdnaTest ColonCancerSelect/Detect analysiert. Die Intra-Assay- und die Inter-Assay-Reproduzierbarkeit betragen 100 % (Tabelle 7).

Tabelle 7. Reproduzierbarkeit des AdnaTest ColonCancer Select/Detect

Bediener	Positive AdnaTest-Ergebnisse/Proben	Intra-Assay-Reproduzierbarkeit (%)	Inter-Assay-Reproduzierbarkeit (%)
A	10/10	100	100
B	10/10	100	100

Präzision

Zur Bestimmung der Präzision wurden Aliquots von cDNA gepoolt und mit dem AdnaTest ColonCancerDetect analysiert. Zwei Bediener führten jeweils 3 unabhängige Messungen von 10 cDNA-Proben durch, d. h. insgesamt 30 Messungen. Die Intra-Assay- und die Inter-Assay-Präzision betragen 100 % (Tabelle 8).

Tabelle 8. Präzision des AdnaTest ColonCancerDetect

Bediener	Positive AdnaTest-Ergebnisse/Proben	Intra-Assay-Präzision (%)	Inter-Assay-Präzision (%)
A	30/30	100	100
B	30/30	100	100

Störsubstanzen

Antikoagulantien

Die Entnahme und der Transport von Blut erfordern die Verwendung von Antikoagulantien. Heparin und Citrat führen jedoch nach Zugabe der immunomagnetischen Beads von AdnaTests zur Bildung von Aggregaten, was dazu führen kann, dass keine oder fehlerhafte Testergebnisse erhalten werden. EDTA und ACDA (Citrat/Dextrose/Adeninlösung A) sind hingegen mit den immunomagnetischen Beads von AdnaTests kompatibel.

Hämolyse

Eine Hämolyse in Blutproben (rot erscheinende Plasmafraktion) ist in den meisten Fällen auf unsachgemäße Transport- oder Lagerungsbedingungen zurückzuführen. Derartige Proben können falsch negative Ergebnisse liefern und sind zu verwerfen.

Chemotherapeutika, zielgerichtete Therapien und Antihormontherapien

Chemotherapeutika (Taxane, Cisplatin, Oxaliplatin, 5-FU, Anthracyclin, Irinotecan usw.) sind starke Zytotoxine, deren Anwesenheit in Blutproben zu Zellschädigungen oder schnellem Zelltod führen. Daher besteht bei Verwendung der immunomagnetischen Beads von AdnaTests eine hohe Wahrscheinlichkeit falsch negativer Ergebnisse. Nach der Verabreichung dieser Wirkstoffe benötigt der menschliche Körper für deren Entgiftung etwa 5 bis 7 Tage (Tabelle 9). Für Blutproben, die während dieses Zeitraums entnommen werden, dürfen keine immunomagnetischen Beads von AdnaTests verwendet werden.

Tabelle 9. Halbwertszeiten von Chemotherapeutika

Wirkstoff	Halbwertszeit	Literatur
5-Fluorouracil	Bis zu 20 Minuten	www.drugs.com/pro/fluorouracil-injection.html
Docetaxel	Bis zu 11,1 Stunden	www.drugs.com/pro/docetaxel.html
Cis-Platin	Bis zu 30 Minuten	www.drugs.com/pro/cisplatin.html
Carboplatin	Bis zu 5,9 Stunden	www.drugs.com/pro/carboplatin.html
Paclitaxel	Ungefähr 25,4 Stunden	www.drugs.com/pro/paclitaxel.html

Die gleiche Vorsichtsmaßnahme wird auch für zielgerichtete Therapieregime wie Antikörper (Herceptin®, Bevacizumab, Cetuximab etc.), Tyrosinkinaseblocker (Olaparib, Iressa®, Erbitux®, Lapatinib usw.) und Antihormontherapien (Tamoxifen, Abirateron, Enzalutamid usw.) empfohlen, wenn diese als Einzelwirkstoffe oder in Kombination mit Chemotherapeutika verabreicht werden.

In klinischen Studien zum Nachweis des prognostischen Werts von zirkulierenden Tumorzellen (CTC), die mit immunomagnetischen Beads von AdnaTests identifiziert und charakterisiert wurden, wurden keine Störungen durch Chemotherapeutika, zielgerichtete Therapien oder Antihormontherapien beobachtet, vorausgesetzt die Wartezeit von mindestens 7 Tagen nach der Verabreichung der Therapie wurde eingehalten. Darüber hinaus wird auf eine mögliche, jedoch nicht wahrscheinliche Beeinträchtigung durch häufig verwendete Begleitmedikationen (Aspirin, Ibuprofen, Aprepitant, Steroide usw.) geachtet.

Störende Umstände

Blutgerinnung

Im Zusammenhang mit klinischen Studien kam es nach der Inkubation mit den immunomagnetischen Beads des AdnaTest zur Blutgerinnung, und zwar am häufigsten bei Patienten in einem späten Krankheitsstadium. Blutproben, in denen Blutgerinnung erkennbar ist, sind während des AdnaTest-Arbeitsablaufs aufgrund der erhöhten Viskosität schwierig zu verarbeiten und schwer zu pipettieren. Diese Proben enthalten ebenfalls eine inakzeptabel hohe Zahl kontaminierter Leukozyten, was zu falsch positiven Ergebnissen führt. Derartige Proben sind zu verwerfen.

Benigne organische und chronisch-entzündliche Erkrankungen

Eine benigne organische Erkrankung und chronische Entzündung wie z. B. Arthritis, benigne Prostatathyperplasie (BPH), Morbus Crohn usw. führen nicht zu falsch positiven AdnaTest-Ergebnissen.

Akute Allergie

Bei akuten allergischen Reaktionen ist die Zahl kontaminierter Leukozyten nach der CTC-Anreicherung mit den immunomagnetischen Beads von AdnaTests erhöht. Daher können falsch positive Ergebnisse nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Klinische Studien

Blutproben von 18 Patienten mit metastatischem Kolonkarzinom wurden vor der Therapie und im Frühstadium der Therapie analysiert, um die (3 Monate nach Therapiebeginn erhaltenen) klinischen CT-Daten mit den Ergebnissen des AdnaTest zu vergleichen. Die Gesamt-CTC-Positivität vor der Therapie betrug 67 % (12/18). Von diesen 12 Patienten sprachen 4 nicht auf die Therapie an, bei 2 Patienten blieb die Krankheit stabil und 6 sprachen auf die Therapie an (partielle Remission). Die CTC lagen bei 75 % der Non-Responder dauerhaft vor. Demgegenüber waren Sie bei 100 % der Patienten, die auf die

Therapie ansprechen (Responder-Gruppe), bereits im Frühstadium der Therapie nicht mehr vorhanden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die CTC-Analyse bei metastatischem Kolonkarzinom ein frühes Anzeichen für ein Ansprechen auf die Therapie ist. (Lankiewicz et al. 2008) geschätzt.

Literatur

Lankiewicz, S., Zimmermann, S., Hollmann, C., Hillemann, T., and Greten, T.F. (2008) Circulating tumour cells as a predictive factor for response to systemic chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Mol. Oncol.* **2**, 349–55.

Abkürzungen

AdnaMag-L	Magnetpartikel-Konzentrator (-groß)
AdnaMag-S	Magnetpartikel-Konzentrator (-klein)
BP	Basenpaare
C+	Positivkontrolle
C-	Negativkontrolle
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEA	Karziñoembryonisches Antigen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor
GA733-2	Gastrointestinaltumor-assoziiertes Antigen 7332
kb	Kilobasen
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription

Symbole



Kit enthält Reagenzien für <N> Tests.



Verwendbar bis



Zulässiger Temperaturbereich



Katalognummer



Gebrauchsanweisung beachten



Hersteller



In-vitro-Diagnostikum



Materialnummer



Global Trade Item Number (Globale Artikelnummer)

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
AdnaTest ColonCancerSelect	Zur Isolierung von CTC und anschließender Extraktion von mRNA aus humanem Vollblut für 12 Zubereitungen	395422
AdnaTest ColonCancerDetect	RT-PCR-Kit zum Nachweis von Kolonkarzinom-assoziiierter Genexpression in angereicherten Tumorzellen	396422
Verwandte Produkte		
AdnaTube	12 Probenröhrchen mit EDTA. Nur mit antikoaguliertem Blut verwenden, das in A-CDA-Blutentnahmeröhrchen von BD entnommen wurde	399932
AdnaMag-L	Für 8 Röhrchen, 15 ml	399921
AdnaMag-S	Für 8 Röhrchen, 1,5 ml	399911
Sensiscript RT Kit (50)	Für 50 Reverse-Transkription-Reaktionen: * Sensiscript Reverse Transkriptase, 150 µl 10x Puffer RT, 100 µl dNTP Mix (enthält 5 mM von jedem dNTP), 1,1 ml RNase-freies Wasser	205211
HotStarTaq Master Mix Kit (250 U)	3 x 0,85 ml HotStarTaq Master Mix (enthält 250 Einheiten HotStarTaq DNA Polymerase, PCR-Puffer mit 3 mM MgCl ₂ und 400 µM von jedem dNTP) und 2 x 1,7 ml RNase-freies Wasser	203443

* Das Sensiscript RT Kit (50) reicht bei Verwendung des AdnaTest ColonCancerDetect nur für 25 Proben, weil für jede Reaktion das doppelte Volumen erforderlich ist.

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Hinweise finden Sie im Handbuch oder der Gebrauchsanweisung des jeweiligen QIAGEN Kits. Handbücher und Gebrauchsanweisungen zu QIAGEN Kits finden Sie im Internet unter www.qiagen.com oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder bei Ihrem örtlichen Händler angefordert werden.

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für AdnaTest ColonCancerSelect und AdnaTest ColonCancerDetect

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Nutzer des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen und nur mit den Komponenten, die im Kit mitgeliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen seiner Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zu den Kits gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zu den Kits gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der Anwendungen, die in den mit dem Produkt, diesem Handbuch, bereitgestellten Protokollen sowie zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschrieben werden. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN-Anwendern für andere QIAGEN-Anwender zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN nicht eingehend geprüft oder optimiert. QIAGEN übernimmt für diese Protokolle keine Garantie und garantiert auch nicht, dass sie keine Rechte Dritter verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieses Kit und/oder die mit diesem Kit durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieses Kit und seine Komponenten sind für den einmaligen Gebrauch lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, aufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Nutzer des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen könnten oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder seinen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können unter www.qiagen.com nachgelesen werden.

Marken: QIAGEN®, Sample to Insight®, HotStarTaq®, Sensiscrip® (QIAGEN Group); Agilent® (Agilent Technologies, Inc.); ERBITUX® (ImClone LLC., eine hundertprozentige Tochtergesellschaft von Eli Lilly and Company); Herceptin® (Genentech, Inc.); IRESSA® (AstraZeneca Group) LabChip® (Caliper Life Sciences, Inc.); Sarsted®; S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.); Vacutainer® (Becton Dickinson and Company).

HB-2343-001 © 2017 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen.

Bestellungen www.qiagen.com/shop | Technischer Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com