

Mars 2017

# Håndbok for AdnaTest ColonCancerSelect og ColonCancerDetect



12 (katalognummer 395422)



12 (katalognummer 396422)

For anriking av tumorceller fra fullblod hos pasienter med tykktarmskreft og påvisning av tykktarmskreft-assosiert genekspressjon i anrikede tumorceller

Til in vitro-diagnostisk bruk

Versjon 1

IVD

CE

REF

395422 (AdnaTest ColonCancerSelect)

396422 (AdnaTest ColonCancerDetect)



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
TYSKLAND

R1 MAT

1106497NO

Sample to Insight



# Innhold

Tiltenkt bruk .....	4
Sammendrag og forklaring .....	4
Prosedyreprinsipp .....	5
AdnaTest ColonCancerSelect .....	5
AdnaTest ColonCancerDetect .....	5
Materialer som følger med .....	7
Settets innhold .....	7
Materialer som er nødvendige, men som ikke følger med .....	9
AdnaTest ColonCancerSelect .....	9
AdnaTest ColonCancerDetect .....	10
Advarsler og forholdsregler .....	11
Sikkerhetsinformasjon .....	11
Informasjon om bruk .....	11
Patenter .....	11
Håndtering og oppbevaring av reagenser .....	11
Oppbevaring .....	11
Håndtering .....	12
Håndtering og oppbevaring av prøver .....	13
Prøveklargjøring .....	13
Protokoll: Anriking av tumorceller med AdnaTest ColonCancerSelect .....	14
Protokoll: Påvisning av tykktarmskreft-assosiert genekspresjon i anrikede tumorceller med AdnaTest ColonCancerDetect .....	17

---

Protokoll: Multiplex-PCR .....	22
Tolkning av resultater .....	24
Fragmentanalyse på Agilent 2100 Bioanalyser .....	24
Feilsøkningsveiledning .....	26
Kvalitetskontroll .....	26
Begrensninger .....	26
Ytelseegenskaper .....	27
Gjenfinning .....	27
Spesifisitet .....	27
Reproduserbarhet .....	28
Presisjon.....	28
Interfererende substanser.....	29
Interfererende betingelser .....	30
Kliniske studier .....	31
Referanse.....	31
Forkortelser .....	32
Symboler .....	32
Bestillingsinformasjon .....	33

---

## Tiltenkt bruk

AdnaTest ColonCancerSelect er en in vitro-diagnostisk metode beregnet på immunkjemisk anriking av sirkulerende tumorceller fra antikoagulerede fullblodsprøver hentet fra pasienter med tykktarmskreft, gjennom en kombinasjon av epiteliale og tumorassosierte antigener.

AdnaTest ColonCancerDetect er en in vitro-diagnostisk analyse beregnet på analyse av ekspressionsprofiler for tumorceller ved revers transkripsjon og multiplex-PCR samt påfølgende densitometrisk analyse av PCR-produktene ved automatisk kapillær elektroforese med Agilent® 2100 Bioanalyser.

AdnaTest ColonCancerSelect/Detect er ikke beregnet på screeningformål og skal ikke brukes som en diagnostisk test for å bekrefte forekomst av tykktarmskreft.

Produktet er beregnet for bruk av profesjonelle brukere, for eksempel teknikere og leger som har fått opplæring i molekylærbiologiske teknikker.

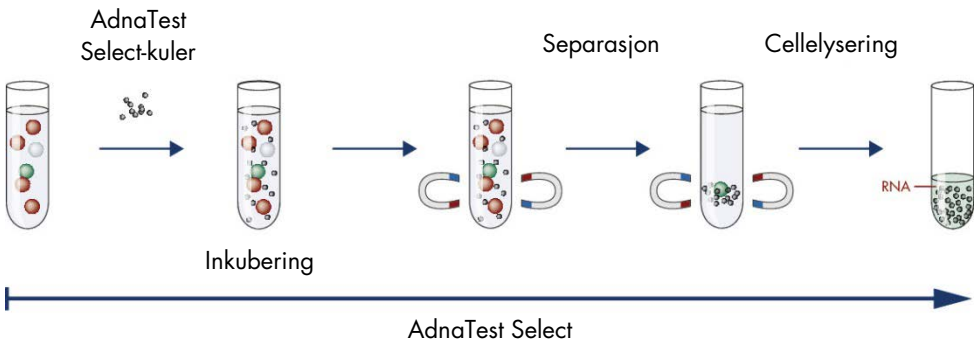
## Sammendrag og forklaring

AdnaTest ColonCancerSelect muliggjør immunmagnetisk anriking av tumorceller via epiteliale og tumorassosierte antigener. AdnaTest ColonCancerDetect brukes til analyse av tykktarmskreft-assosiert genekspressjon i immunmagnetisk anrikede tumorceller ved revers transkripsjon og PCR.

# Prosedyreprinsipp

## AdnaTest ColonCancerSelect

Antistoffer mot epiteliale og tumorassosierte antigener konjugert til magnetiske kuler for merking av tumorceller i fullblod. Merkede celler blir ekstrahert ved en magnetisk partikkelkonsentrator (AdnaMag-L og AdnaMag-S) og deretter lysert (figur 1 og 2).



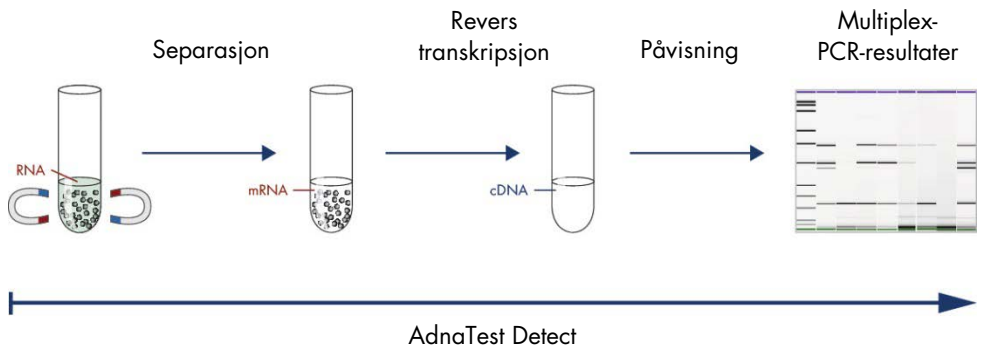
- ● Blodceller ● Tumorceller
- Antistoff- eller Oligo (dT)<sub>25</sub>-belagte magnetiske kuler

**Figur 1. AdnaTest ColonCancerSelect: Immunmagnetisk celleseleksjon med flere tumorassosierte antistoffer.**

Cellelysatet blir brukt for videre analyse med AdnaTest ColonCancerDetect.

## AdnaTest ColonCancerDetect

AdnaTest ColonCancerDetect inneholder Oligo (dT)<sub>25</sub>-kuler for isolering av mRNA fra lysatet av forhåndsanrikede tumorceller. Revers transkripsjon gir cDNA som deretter brukes som templat for påvisning av tumorceller og karakterisering av multiplex-PCR. AdnaTest PrimerMix ColonDetect muliggjør amplifikasjon av tre tumorassosierte antigener og ett kontrollgen.



- Blodceller ● Tumorceller
- ⊗ Antistoff- eller Oligo (dT)25-belagte magnetiske kuler

**Figur 2. AdnaTest ColonCancerDetect: Multiplex-PCR av ulike kreftassosierte tumormarkører.** I et andre trinn blir de anrikede cellene undersøkt ved RT-PCR for tumorassosierte ekspresjonsmønstre. mRNA-trådene blir omvendt transkribert til cDNA. Deretter kan flere assosierte tumormarkører amplifiseres med multiplex-PCR og visualiseres.

Primerne genererer fragmenter med følgende størrelser:

- GA733-2: 395 bp
- CEA: 231 bp
- EGFR: 163 bp
- Aktin: 120 bp (intern PCR-kontroll)

**Merk:** Fragmentstørrelser kan variere noe. Sørg for å bruke AdnaTest Positive Control Colon ved tilordning av de påviste signalene.

# Materialer som følger med

## Settets innhold

<b>AdnaTest ColonCancerSelect</b>			
<b>Katalognummer</b>	<b>395422</b>		
<b>Antall tester</b>	<b>12</b>		
Collection Tubes	Collection Tubes (1.5 ml) (Prøverør (1,5 ml))	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	3 x 5
Collection Tubes	Collection Tubes (15 ml) Prøverør (15 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	24
Rød	ColonSelect Beads (ColonSelect-kuler)	CSB	1,2 ml
Rød	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (AdnaTest lyserings-/ bindingsbuffer)	LBB	2 x 1,2 ml
	Håndbok (engelsk)		1

<b>AdnaTest ColonCancerDetect</b>			
<b>Katalognummer</b>	<b>396422</b>		
<b>Antall tester</b>	<b>12</b>		
<b>AdnaTest RNA Reagents (AdnaTest RNA-reagenser)</b>			<b>Eske 1</b>
Rød	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (AdnaTest lyserings-/bindingsbuffer)	LBB	2 ml
Oransje	Oligo(dT) <sub>25</sub> Beads (Oligo(dT) <sub>25</sub> -kuler)	OdT	280 µl
Hvit	RNA Purification Buffer A (RNA-rensbuffer A)	BA	4ml
Hvit	RNA Purification Buffer B (RNA-rensbuffer B)	BB	4ml
Lilla	Tris-HCL Buffer (Tris-HCL-buffer)	TB	2 ml
<b>AdnaTest ColonCancerDetect</b>			<b>Eske 2</b>
Blå	AdnaTest PrimerMix ColonDetect	PMC	144 µl
Oransje	AdnaTest Positive Control Colon (C+) (Positiv AdnaTest-kontroll for tykktarm (C+))	<b>CONTROL +</b>	56 µl
	Håndbok (engelsk)		1

Det er tilstrekkelig med AdnaTest ColonCancerDetect-reagenser til å analysere 6 PCR-kontroller og 12 blodprøver.



# Materialer som er nødvendige, men som ikke følger med

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablad (safety data sheet, SDS) som leveres av leverandøren av produktet, hvis du ønsker mer informasjon.

## AdnaTest ColonCancerSelect

### Utstyr

- Tube rotator for 15 ml and 1.5 ml tubes (Rørrotator for 15 ml og 1,5 ml rør) (f.eks. ELMI Ltd., katalognr. IMIX-03)
- Konsentratorer for magnetiske partikler
  - AdnaMag-L (katalognr. 399921)
  - AdnaMag-S (katalognr. 399911)

### Materiale

- AdnaTube (AdnaTube-rør) (katalognr. 399932) ved arbeid med BD Vacutainer® ACD-A-rør
- Sterile, RNase-frie 10 ml glass- eller plastpipetter og pipetteringsenhet
- Sterile, RNase-free 1.5 ml reaction tubes (Sterile, RNase-frie 1,5 ml reagensrør) (f.eks. Sarstedt, katalognr. 72.690)
- Pipetter og RNase-frie pipettespisser med aerosolbarriere, egnet for pipetteringsvolumer fra 100 µl til 1000 µl

### Reagenser

- Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.0–7.3 (Fosfatbufret saltvann (PBS), pH 7,0–7,3) (f.eks. Fisher, katalognr. VX14190169, D-PBS)

# AdnaTest ColonCancerDetect

## Utstyr

- Tube rotator for 1.5 ml tubes (Rørrotator for 1,5 rør) (f.eks. ELMI Ltd., katalognr. IMIX-03)
- Magnetic particle concentrator AdnaMag-S (AdnaMag-S-konsentrator for magnetiske partikler) (katalognr. 399911)
- Termoblokk eller et vannbad (50°C)
- Termosykler med oppvarmet lokk og en oppvarmingshastighet på 2 °C/s.
- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)

## Materiale

- Sterile, RNase-frie 0,2 ml PCR-rør med tynn vegg
- Sterile, RNase-free 1.5 ml reaction tubes (Sterile, RNase-frie 1,5 ml reagensrør) (f.eks. Sarstedt, katalognr. 72.690)
- Pipetter og RNase-frie pipettespisser med aerosolbarriere, egnet for pipetteringsvolumer fra 1 µl til 200 µl

## Reagenser

- Sensiscript® RT Kit (Sensiscript® RT-sett) (QIAGEN, katalognr. 205211, 50 reaksjoner)
  - **Merk:** Sensiscript RT-sett (katalognr. 205211) rekker kun til 25 prøver fordi det kreves dobbelt volum for hver reaksjon.
- Rekombinant RNAsin, RNase-hemmer, 2,500 E (Promega, katalognr. N2511)
- HotStarTaq® Master Mix Kit (HotStarTaq® Master Mix-sett) (QIAGEN, katalognr. 203443, 250 E)
- Knust is

---

# Advarsler og forholdsregler

Til in vitro-diagnostisk bruk

## Sikkerhetsinformasjon

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Du finner mer informasjon i de aktuelle sikkerhetsdatabladene (SDS). Disse er tilgjengelige i praktisk og kompakt PDF-format på [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) der du kan søke etter, vise og skrive ut sikkerhetsdatabladet for hvert QIAGEN-sett og hver settkomponent.

Kast prøve- og analyseavfall i henhold til lokale sikkerhetsprosedyrer.

## Informasjon om bruk

Disse testene må utføres av personell med kompetanse innen molekylærbiologiske teknikker.

## Patenter

AdnaTest ColonCancerDetect krever lisenser fra Hoffmann-La Roche AG, Basel. Kjøp av AdnaTest ColonCancerDetect tillater ikke brukeren å utføre PCR uten lisens.

# Håndtering og oppbevaring av reagenser

## Oppbevaring

AdnaTest ColonCancer-systemet leveres i tre esker. AdnaTest ColonCancerSelect (katalognr. 395422) og AdnaTest RNA Reagent Box 1 (eske 1 av katalognr. 396422) må oppbevares ved 2–8 °C. Komponentene må ikke brukes etter utløpt holdbarhetsdato.

---

AdnaTest ColonCancerDetect Box 2 (eske 2 av katalognr. 396422), som inneholder AdnaTest PrimerMix ColonDetect og AdnaTest Positive Control Colon, må oppbevares adskilt ved  $-30$  til  $-15$  °C. Primerblandingen skal alikvoteres slik at mulig kontaminering og gjentatte temperaturendringer forhindres. Komponentene må ikke brukes etter utløpt holdbarhetsdato.

## Håndtering

- ColonSelect-kuler inneholder natriumazid som konserveringsmiddel. Natriumazid er cytotoxisk og må derfor fjernes før du bruker kulene. (Se "Protokoll: Anriking av tumorceller med AdnaTest ColonCancerSelect", side 14.)
- Alle komponenter og ekstra reagenser som leveres av andre leverandører, må oppbevares i henhold til instruksjonene. Følg sikkerhetsrådene fra de aktuelle produsentene.
- Bruk vernehansker for å unngå kontaminering med DNA, RNA og RNaser.
- Alikvoter ColonSelect-kuler for å unngå kontaminering.
- Testen må utføres i angitt rekkefølge og må overholde alle spesifikasjoner angitt i forbindelse med inkubasjonstider og -temperaturer.
- Kast prøvene hvis seleksjonskulene agglutinerer under celledanring.
- Utfør prøvebehandling, inkludert revers transkripsjon og påfølgende analyse av amplifiserte PCR-produkter, i forskjellige rom hvis det er mulig, for å unngå krysskontaminering.
- Bruk av produkter fra andre leverandører enn de som er foreslått, kan påvirke resultatene negativt.
- Følg laboratoriets sikkerhets- og hygieneforskrifter (f.eks. bruk laboratoriefrakker, vernebriller, hansker).

# Håndtering og oppbevaring av prøver

## Prøveklargjøring

- Blodprøver må tas før bruk av terapeutiske stoffer. Ikke bruk AdnaTest ColonCancerSelect tidligere enn 7 dager etter siste terapeutiske intervensjon!
- Blodprøvetaking: Hvis prøven skal transporteres i mindre enn 4 timer, bruker du rør som inneholder EDTA som antikoagulant (f.eks. S Monovette® K3 EDTA, Sarstedt [katalognr. 01.1605.001]) for å ta minst 7,5 ml fullblod.
- Hvis prøven skal transporteres i mer enn 4 timer, bruker du BD Vacutainer ACD-A-rør (Becton Dickinson GmbH, katalognr. 366645 [EU]; 364606 [US]) for å ta minst 8,5 ml fullblod. Før videre behandling med AdnaTest, må 5 ml ACD-A-blod overføres i et AdnaTube, katalognr. 399932.
- Blodet må oppbevares ved 4–8 °C umiddelbart.
- Prøvene skal behandles så snart som mulig, men ikke senere enn 4 timer etter blodprøvetaking ved bruk av standard EDTA-rør eller innen 30 timer ved bruk av BD Vacutainer-blodprøverør i kombinasjon med AdnaTubes.
- Blodprøven må ikke hemolyseres.

# Protokoll: Anriking av tumorceller med AdnaTest ColonCancerSelect

## Viktige punkter før du starter

- Før du starter prosedyren, må du lese "Advarsler og forholdsregler" (side 11), "Håndtering og oppbevaring av reagenser" (side 11) og "Håndtering og oppbevaring av prøver" (side 13).
- Natriumazid må fjernes ved å vaske ColonSelect-kulene før bruk, som beskrevet nedenfor i "Prosedyre A: Klargjøring av ColonSelect-kuler".
- Prøverørene på 1,5 ml skal kun brukes til det angitte protokolltrinnet.

## Ting du skal gjøre før du starter

- Forsikre deg om at AdnaTest lyserings-/bindingsbuffer er stabilisert til romtemperatur. Hvis det blir observert bunnfall, må reagensene stabiliseres til romtemperatur og blandes til bunnfallet er fullstendig oppløst.

## Prosedyre A: Klargjøring av ColonSelect-kuler

1. Resuspender ColonSelect-kuler grundig ved pipettering. Skal ikke blandes i vorteksmikser!
2. Beregn volumet av ColonSelect-kuler som trengs for alle prøver som skal behandles (100 µl per prøve), og overfør det beregnede volumet til et 1,5 ml reagensrør (følger ikke med).  
Hvis mer enn 10 prøver behandles, må det brukes flere 1,5 ml reagensrør.
3. Sett røret inn i AdnaMag-S.
4. Fjern supernatanten med en pipette etter 1 minutt.  
**Merk:** Ikke ta på kulene når du fjerner supernatantene!
5. Vasketrinn:
  - 5a. Fjern magnetskyveenheten fra AdnaMag-S.
  - 5b. Tilsett 1 ml PBS, og resuspender kulene ved gjentatt pipettering.

- 5c. Sett magnetskyveenheten inn i AdnaMag-S.
- 5d. Fjern supernatanten helt med en pipette etter 1 minutt.
- 5e. Gjenta trinn 5a til 5d to ganger (tre vaskinger totalt).
6. Fjern røret fra AdnaMag-S, og resuspender kulene i PBS til originalvolumet (100 µl per prøve). Fortsett med "Prosedyre B: Seleksjon av tumorceller", nedenfor.

### Prosedyre B: Seleksjon av tumorceller

1. Ved bruk av standard EDTA-rør pipetteres 5 ml av en blodprøve i et 15 ml prøverør (følger med).  
Ved bruk av ACD-A-blod i et BD Vacutainer ACD-A-rør overføres 5 ml blod til et AdnaTube.  
**Merk:** AdnaTubes er obligatoriske ved bruk av BD Vacutainer ACD-A-rør.
2. Resuspender ColonSelect-kulene grundig (klargjort i trinn 6 av prosedyre A) ved pipettering, og tilsett 100 µl av disse kulene i hver blodprøve.
3. Roter rørene langsomt (ca. 5 o/min) i 30 minutter ved romtemperatur på en enhet med både vippe- og dreiefunksjon.
4. Sett rørene inn i AdnaMag-L uten magnetskyveenheten. Snu AdnaMag-L nedover for å frigjøre kuler som er fanget i overdelen.
5. Sett inn magnetskyveenheten, og inkuber rørene i AdnaMag-L i 3 minutter ved romtemperatur.
6. Fjern blodsupernatanten helt med en 10 ml pipette uten å berøre kulene.  
**Merk:** Ikke ta på kulene når du fjerner supernatantene!
7. Vasketrinn:
  - 7a. Fjern magnetskyveenheten fra AdnaMag-L.
  - 7b. Tilsett 5 ml PBS. Sett lokk på rørene, og rist *AdnaMag-L* forsiktig frem og tilbake 5 ganger for å resuspendere de magnetiske kulene/cellekomplekser.
  - 7c. Snu AdnaMag-L med rørene vendt nedover to ganger for å frigjøre dråper som er fanget i overdelen.
  - 7d. Sett magnetskyveenheten inn i AdnaMag-L, og inkuber i 1 minutt ved romtemperatur.

- 
- 7e. Fjern supernatanten helt med en pipette.
  - 7f. Gjenta trinn 7a til 7e to ganger (tre vaskinger totalt).
  8. Fjern magnetskyveenheten fra AdnaMag-L.
  9. Resuspender magnetiske kuler/cellekomplekser i 1 ml PBS, og overfør hver prøve til et 1,5 ml reagensrør (følger ikke med).
  10. Sett reagensrørene inn i AdnaMag-S med en innsatt magnetskyveenhet.  
**Merk:** Magnetskyveenheten til AdnaMag-S kan settes inn i to posisjoner. Skyveenheten må alltid settes inn med den hvite plasfilmen vendt fremover, slik at magnetene kommer ved siden av reagensrørene.
  11. Etter 1 minutt skal supernatanten fjernes helt med en pipette for å optimalisere følgende cellelysering.
  12. Fjern magnetskyveenheten fra AdnaMag-S.
  13. Tilsett 200 µl AdnaTest lyserings-/bindingsbuffer (stabilisert til romtemperatur) i hvert reagensrør. Resuspender ved pipettering minst fem ganger.
  14. Sett magnetskyveenheten inn i AdnaMag-S, og inkuber i 1 minutt.
  15. Overfør hver supernatant (cellelysat) til et nytt 1,5 ml reagensrør.
  16. Kast rørene med kulene.
  17. Fortsett med mRNA-isolasjon (se "Protokoll: Påvisning av tykktarmskreft-assosiert genespresjon i anrikede tumorceller med AdnaTest ColonCancerDetect", side 17) umiddelbart, eller oppbevar cellelysatsene ved  $-20^{\circ}\text{C}$  i maksimalt 2 uker.



# Protokoll: Påvisning av tykktarmskreft-assosiert genekspresjon i anrikede tumorceller med AdnaTest ColonCancerDetect

## Viktige punkter før du starter

- Før du starter prosedyren, les "Advarsler og forholdsregler" (side 11) og "Håndtering og oppbevaring av reagenser" (side 11).
- Prosedyrene A til C beskriver isolasjonen av mRNA og revers transkripsjon.
- Prøverørene på 1,5 ml skal kun brukes til det angitte protokolltrinnet.

## Ting du skal gjøre før du starter

- Forsikre deg om at AdnaTest lyserings-/bindingsbuffer er stabilisert til romtemperatur. Hvis det blir observert bunnfall, må reagensene stabiliseres til romtemperatur og blandes til bunnfallet er fullstendig oppløst.
- Stabiliser RNA-rensbuffer A og RNA-rensbuffer B til romtemperatur. Legg Tris-HCL-buffer på is.
- Tin 10x buffer RT og dNTP-er fra Sensiscript RT-settet ved romtemperatur. Bland ved vorteksering. Sentrifuger et kort øyeblikk, og oppbevar på is. Tin RNase-fritt vann (del av Sensiscript-settet).
- Reguler en termoblokk eller et vannbad til 50°C.

## Prosedyre A: Klargjøring av Oligo(dT)<sub>25</sub>-kuler

1. Resuspender Oligo(dT)<sub>25</sub>-kulene grundig ved pipettering. Ikke vorteks!
2. Beregn volumet av kulene som trengs for alle prøver som skal behandles (20 µl per prøve pluss 10 %), og overfør det beregnede volumet til et RNase-fritt 1,5 ml reagensrør (følger ikke med).

3. Sett røret inn i AdnaMag-S.

**Merk:** Magnetskyveenheten til AdnaMag-S kan settes inn i to posisjoner. Skyveenheten må alltid settes inn med den hvite plastfilmen vendt fremover, slik at magnetene kommer ved siden av reagensrørene.

4. Fjern supernatanten med en pipette etter 1 minutt.

5. Vasketrinn:

5a. Fjern magnetskyveenheten fra AdnaMag-S.

5b. Tilsett originalvolumet (trinn 2, side 17) med AdnaTest lyserings-/bindingsbuffer, og resuspender kulene ved gjentatt pipettering. Resuspender forsiktig for å unngå skumming.

5c. Sett magnetskyveenheten inn i AdnaMag-S.

5d. Fjern supernatanten helt etter 1 minutt.

5e. Gjenta trinn 5a til 5d én gang (to vaskinger totalt).

6. Fjern røret fra AdnaMag-S, og resuspender kulene i AdnaTest lyserings-/bindingsbuffer til originalvolumet (trinn 2, side 17). Fortsett med "Prosedyre B: mRNA-isolasjon".

## Prosedyre B: mRNA-isolasjon

1. Tilsett 20 µl Oligo(dT)<sub>25</sub>-kuler (trinn 6, ovenfor) i hvert rør som inneholder cellelysat (trinn 15, side 16).

2. Roter rørene langsomt (ca. 5 o/min) i 10 minutter ved romtemperatur på en enhet med både vippe- og dreiefunksjon.

3. Sett rørene inn i AdnaMag-S uten magnetskyveenheten. Snu AdnaMag-S nedover for å frigjøre kuler og væske som er fanget i overdelen.

4. Sett inn magnetskyveenheten, og fjern supernatanten etter 1 minutt.

5. Vasketrinn 1:

5a. Fjern magnetskyveenheten fra AdnaMag-S.

5b. Tilsett 100 µl RNA-rensbuffer A i hvert rør, og resuspender kulene ved gjentatt pipettering. Skyll korken og rørveggen grundig for å unngå tap av kuler.

- 5c. Sett magnetskyveenheten inn i AdnaMag-S.
  - 5d. Fjern supernatanten helt etter 1 minutt.
  - 5e. Gjenta trinn 5a til 5d én gang (to vaskinger totalt).
6. Vasketrinn 2:
- 6a. Fjern magnetskyveenheten fra AdnaMag-S.
  - 6b. Tilsett 100 µl RNA-rensbuffer B i hvert rør. Resuspender kulene ved pipettering, og overfør dem til nye 1,5 ml reagensrør (følger med).
  - 6c. Sett magnetskyveenheten inn i AdnaMag-S.
  - 6d. Fjern supernatanten helt etter 1 minutt. Dette trinnet må utføres nøye (følg med på pelleten) siden kulene kan gli og bli fjernet ved en feiltakelse.
  - 6e. Gjenta trinn 6a til 6d én gang i de samme reagensrørene (to vaskinger totalt).
7. Fjern magnetskyveenheten fra AdnaMag-S.
8. Tilsett 100 µl iskald Tris-HCL-buffer i hvert rør, og resuspender kulene ved gjentatt pipettering.
9. Sett magnetskyveenheten inn i AdnaMag-S.
10. Fjern supernatanten helt etter 1 minutt.
11. Fjern magnetskyveenheten fra AdnaMag-S.
12. Resuspender mRNA/kule-kompleks i 29,5 µl RNase-fritt vann.
13. Overfør rørene til en termoblokk eller et vannbad, og inkuber i 5 minutter ved 50 °C.
14. Legg rørene på is umiddelbart i minst 2 minutter.
15. Fortsett umiddelbart (innen 5 minutter) med revers transkripsjon (Prosedyre (C): Revers transkripsjon med Sensiscript RT-settet).
- mRNA/kule-komplekset skal ikke oppbevares!

## Prosedyre (C): Revers transkripsjon med Sensiscript RT-settet

1. Klargjør RT Master Mix på is. RT Master Mix klargjøres som vist i tabell 1 i henhold til antall prøver.

Volumet av RT Master Mix skal være 10 % større enn beregnet for det totale antallet reaksjoner med revers transkripsjon. En negativ kontrollreaksjon uten tilsetning av mRNA må alltid være klargjort (RT-kontroll).

2. Vorteks RT Master Mix. Sentrifuger et kort øyeblikk, og pipetter 10,5 µl for hver reaksjon i 0,2 ml PCR-rør.
3. Resuspender mRNA/kule-kompleksene (trinn 10, side 19) forsiktig med en pipette. Overfør det totale volumet til 0,2 ml PCR-reagensrør som inneholder RT Master Mix. Bland grundig ved gjentatt pipettering.

**Tabell 1. Reaksjonsoppsett for revers transkripsjon**

<b>Komponent</b>	<b>Volum</b>
<b>RT Master Mix</b>	
10 × buffer RT	4,0 µl
dNTP Mix (5 mM hver dNTP)	4,0 µl
RNase-hemmer, 40 U/µl (Promega)	0,5 µl
Sensiscript revers transkriptase	2,0 µl
<b>Mal-RNA*</b>	29,5 µl
mRNA/kule-kompleks eller RNase-fritt vann	
<b>Totalt volum</b>	<b>40,0 µl</b>

\* Som RT-kontroll skal det tilsettes 29,5 µl RNase-fritt vann i stedet for mRNA/kule-kompleks. Volumet av mRNA/kule-komplekset kan variere noe. Bruk alltid det totale volumet av dette i reaksjonen med revers transkripsjon.

4. cDNA blir syntetisert i en termosyklus under følgende betingelser (tabell 2).

**Tabell 2. Program for revers transkripsjon**

Trinn	Klokkeslett	Temperatur
Revers transkripsjon	60 minutter	37 °C
Denaturering	5 minutter	93 °C
Kjøling	∞	4 °C

5. Legg reagensrør med cDNA på is, eller oppbevar dem ved -20 °C i maksimalt 4 uker.

6. Fortsett med "Protokoll: Multiplex-PCR", side 22.

---

# Protokoll: Multiplex-PCR

## Viktig punkt før du starter

- Før du starter prosedyren, les "Advarsler og forholdsregler" (side 11) og "Håndtering og oppbevaring av reagenser" (side 11).

## Ting du skal gjøre før du starter

- Tin HotStarTaq Master Mix (QIAGEN), AdnaTest Positive Control Colon, AdnaTest PrimerMix ColonDetect og RNase-fritt vann. Vorteks, sentrifuger raskt, og oppbevar på is.

## Prosedyre

1. PCR Master Mix klargjøres som vist i tabell 3 i henhold til antall prøver.  
Volumet av PCR Master Mix skal være minst 10 % større enn det nødvendige volumet beregnet ut fra antall prøver. Vær oppmerksom på at AdnaTest Positive Control Colon, RNase-fritt vann som negativ kontroll og RT-kontrollen alltid må være inkludert.
2. For hvert preparat skal 42,0 µl PCR Master Mix pipetteres i 0,2 ml PCR-reagensrør. Resuspender cDNA/kule-blandingen ved pipettering, og tilsett 8,0 µl av den i hvert reagensrør.  
**Merk:** Som negativ kontroll skal det tilsettes 8,0 µl RNase-fritt vann i stedet for cDNA.

**Tabell 3. Klargjøring av multiplex-PCR**

Komponent	Volum
<b>Multiplex-PCR Master Mix</b>	
HotStarTaq Master Mix	25,0 µl
RNase-fritt vann	13,0 µl
AdnaTest PrimerMix ColonDetect	4,0 µl
cDNA eller RT-kontroll eller negativ kontroll (RNase-fritt vann) eller AdnaTest Positive Control Colon, hver:	8,0 µl
<b>Totalt volum</b>	<b>50,0 µl</b>

3. En termosyklus brukes til PCR i henhold til programmet som er beskrevet i tabell 4. Kjør termosyklern med en rampe på 2 °C/sekund. PCR blir utført med totalt 38 sykluser.

**Tabell 4. PCR-syklusprogram**

Trinn	Klokkeslett	Temperatur
<b>Innledende aktiveringstrinn</b>	15 minutter	95 °C
<b>3-trinns syklus</b>		
Denaturering	45 sekunder	94 °C
Hybridisering	45 sekunder	58 °C
Forlengelse	45 sekunder	72 °C
<b>Endelig forlengelse</b>	10 minutter	72 °C
<b>Kjøling</b>	∞	4 °C

# Tolkning av resultater

## Fragmentanalyse på Agilent 2100 Bioanalyser

Analyse utføres med Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies) på en DNA 1000 LabChip®. Følg instruksjonene i brukerhåndboken for DNA 1000 LabChip, og sørg for at ingen kuler overføres til LabChip. Magnetiske kuler i gelen kan føre til falske resultater.

1. Start Bioanalyser-programvaren "2100 expert". Velg **Instrument** under **Contexts** (Kontekster), og klikk deretter på knappen **Assay** (Analyse) ved siden av **Assay Selection** (Analysevalg).
2. Velg **Electrophoresis > DNA 1000 Series II.xsy** (Elektroferese > DNA 1000 Series II.xsy). Klargjør brikken, og start analyseringen.
3. Angi en terskel for påvisning for å evaluere resultatene:
  - 3a. Velg **Data** under **Contexts** (Kontekster), og klikk deretter på fanen **Assay Properties** (Analyseegenskaper). Velg **Global** og **Normal** i rullegardinmenyen til høyre.
  - 3b. Velg **Sample Setpoints > Integrator > height threshold (FU)** (Innstillingspunkter for prøver > Integrator > høydeterskel (FU), og angi denne verdien som **0** (standardverdi er **20**) for å påvise alle signaler.

### Analyse av resultatene

Testen anses som positiv dersom et PCR-fragment av minst ett tumorassosiert transkript tydelig påvises.

Hvis du bruker Agilent 2100 Bioanalyser, er topper med en konsentrasjon på  $\geq 0,10$  ng/ $\mu$ l positive (figur 3).

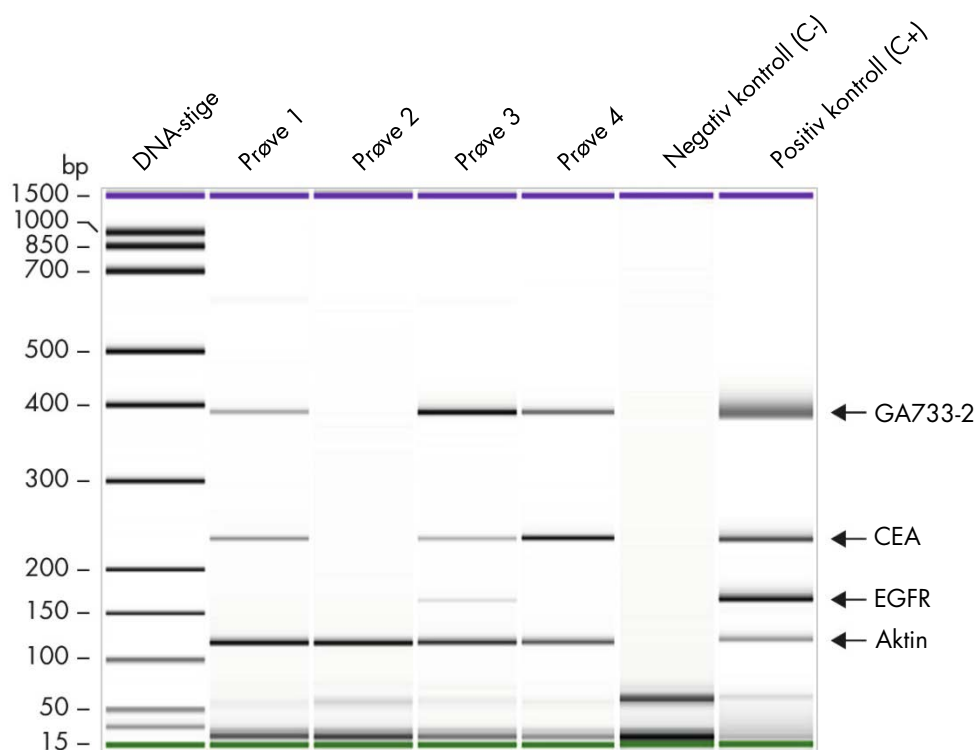
Fragmentet av kontrollgenet aktin må vises i alle testprøver (intern PCR-kontroll). Et aktinsignal gir en positiv kontroll for en vellykket celleseparasjon, revers transkripsjon og multiplex-PCR. Negativ kontroll og RT-kontrollprøver må ikke vise noen bånd som er større enn 80 basepar (primerdimere).



Et fragment som er større enn 900 bp, angir kontaminering med genomisk DNA, og tyder på at det har oppstått et problem under celleseparasjon. Resultatene er ugyldige i dette tilfellet.

**VIKTIG: Hvis ikke protokollen følges til punkt og prikke, kan det føre til falskt negative eller falskt positive resultater.**

Hvis det er behov for hjelp til å tolke resultatene, ta kontakt med vårt supportteam.



**Figur 3. AdnaTest ColonCancerDetect-resultater fra prøver analysert med en Agilent 2100 Bioanalyzer.** Det første feltet viser DNA-størrelsesstandarden (DNA-stigen). Prøve 1 og 4 er positive for GA733-2 og CEA, prøve 2 er negativ, og prøve 3 er positiv for GA733-2, CEA og EGFR. Aktin er påvist i prøve 1 til 4. PCR-negativ (C-) og -positiv kontroll (C+) vises i de siste to feltene.

---

## Feilsøkingeveiledning

Se siden med ofte stilte spørsmål på vårt tekniske supportsenter: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Forskerne ved QIAGENs tekniske serviceavdeling er alltid klare til å besvare eventuelle spørsmål du måtte ha enten om informasjonen og/eller protokollene i denne håndboken eller prøve- og analyseteknologi (for kontaktinformasjon, besøk [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Kvalitetskontroll

I henhold til QIAGENs ISO-sertifiserte kvalitetsstyringssystem testes hvert parti med AdnaTest ColonCancerSelect og AdnaTest ColonCancerDetect mot forhåndsbestemte spesifikasjoner for å sikre konsekvent produktkvalitet.

## Begrensninger

Alle reagenser kan utelukkende brukes i in vitro-diagnostikk.

Produktet skal kun brukes av personale som er spesielt instruert og opplært i in vitro-diagnostiske prosedyrer.

Det er viktig at operatøren leser bruksanvisningen nøye før bruk av systemet.

Strengt samsvar med bruksanvisningen kreves for optimale PCR-resultater.

Kontroller utløpsdatoene som er angitt på komponentenes esker og etiketter. Ikke bruk komponenter etter utløpt holdbarhetsdato.

Alle diagnostiske resultater som genereres, må tolkes i sammenheng med andre kliniske funn eller laboratoriefunn.

## Ytelseegenskaper

### Gjenfinning

To og 10 dyrkede T84 tykktarmskreftceller ble tilsatt i blodprøver fra friske donorer for å bestemme gjenfinningsratene som ble oppnådd med AdnaTest ColonCancerSelect/Detect (tabell 5).

**Tabell 5. AdnaTest ColonCancer-gjenfinningsrate for tumorceller tilsatt i blodprøver fra friske donorer**

	Totalt antall prøver	Antall positive	Gjenfinning
To tumorceller tilsatt i 5 ml blod	63	48	76 %
Ti tumorceller tilsatt i 5 ml blod	41	41	100 %

Gjenfinningsrate er 76 % for påvisning av 2 tumorceller tilsatt i 5 ml blod fra friske donorer. Påvisning av 10 celler tilsatt i 5 ml blod fra friske donorer er 100 %.

### Spesifisitet

AdnaTest ColonCancerSelect/Detect ble brukt til å analysere 106 friske donorer for å bestemme frekvens av falskt positive ved angitt cut-off (0,15 ng/µl fragmentkonsentrasjon for hvert gen som ble testet, unntatt aktin).

**Tabell 6. Bestemmelse av spesifisitet**

Kontroller	Totalt antall prøver	Antall falskt positive	Spesifisitet (%)
Friske donorer	106	2 (2 %)	98

AdnaTest ColonCancerSelect/Detect viste en spesifisitet på 98 % (tabell 6).

## Reproduserbarhet

Tjue blodprøver fra friske donorer ble tilsatt 10 T84 tykktarmskreftceller per prøve. Blodprøver ble analysert av to operatører ved bruk av AdnaTest ColonCancerSelect/Detect for å bestemme reproduserbarheten. Intra-analyse- og inter-analyse-reproduserbarheten var 100 % (tabell 7).

**Tabell 7. Reproduserbarhet for AdnaTest ColonCancer Select/Detect**

<b>Operatør</b>	<b>Positive AdnaTest-resultater/-prøver</b>	<b>Intra-analyse-reproduserbarhet (%)</b>	<b>Inter-analyse-reproduserbarhet (%)</b>
A	10/10	100	100
B	10/10	100	100

## Presisjon

Presisjonen ble bestemt ved å slå sammen alikvoter av cDNA og analysere dem ved hjelp av AdnaTest ColonCancerDetect. To operatører analyserte 30 cDNA-prøver som besto av 3 uavhengige målinger av 10 prøver. Intra-analyse- og inter-analyse-presisjonen var 100 % (tabell 8).

**Tabell 8. Presisjon for AdnaTest ColonCancerDetect**

<b>Operatør</b>	<b>Positive AdnaTest-resultater/-prøver</b>	<b>Intra-analyse-presisjon (%)</b>	<b>Inter-analyse-presisjon (%)</b>
A	30/30	100	100
B	30/30	100	100

---

## Interfererende substanser

### Antikoagulanter

Bruk av antikoagulanter er obligatorisk ved blodprøvetaking og blodtransport. Heparin og sitrat fører imidlertid til aggregatdannelse etter at AdnaTest immunmagnetiske kuler er tilsatt, noe som kan føre til manglende testresultater eller falske testresultater. EDTA og ACDA (sitratt/dekstrose/adeninløsning A) er imidlertid kompatible med AdnaTest immunmagnetiske kuler.

### Hemolyse

Hemolyse i blodprøver (når plasmafraksjonen ser rød ut) skyldes i de fleste tilfeller feil transport eller feil oppbevaringsbetingelser. Slike prøver kan gi falskt negative resultater og skal kastes.

### Kjemoterapeutika, legemidler for målrettet behandling og antihormonelle behandlingsregimer

Kjemoterapeutika (taksaner, cisplatin, oksaliplatin, 5-FU, antracyklin, irinotekan osv.) er potente cytotoksiner og forårsaker skade eller rask celledød i en blodprøve. Dette fører til en stor sannsynlighet for falskt negative resultater ved bruk av AdnaTest immunmagnetiske kuler. Når disse stoffene er administrert, trenger menneskekroppen rundt 5–7 dager til detoksifisering av stoffene (tabell 9). Blodprøver som tas i løpet av denne tiden, må ikke brukes med AdnaTest immunmagnetiske kuler.

**Tabell 9. Halveringstid for kjemoterapeutika**

Legemiddel	Halveringstid	Referanse
5-Fluoruracil	Opptil 20 minutter	<a href="http://www.drugs.com/pro/fluorouracil-injection.html">www.drugs.com/pro/fluorouracil-injection.html</a>
Docetaxel	Opptil 11,1 timer	<a href="http://www.drugs.com/pro/docetaxel.html">www.drugs.com/pro/docetaxel.html</a>
Cisplatin	Opptil 30 minutter	<a href="http://www.drugs.com/pro/cisplatin.html">www.drugs.com/pro/cisplatin.html</a>
Karboplatin	Opptil 5,9 timer	<a href="http://www.drugs.com/pro/carboplatin.html">www.drugs.com/pro/carboplatin.html</a>
Paclitaxel	Rundt 25,4 timer	<a href="http://www.drugs.com/pro/paclitaxel.html">www.drugs.com/pro/paclitaxel.html</a>

Den samme forholdsregelen er også anbefalt for målrettede behandlingsregimer slik som antistoffer (Herceptin<sup>®</sup>, bevacizumab, cetuximab osv.), tyrosinkinasehemmere (olaparib, Iressa<sup>®</sup>, Erbitux<sup>®</sup>, lapatinib osv.) og antihormonelle legemidler (tamoksifen, abirateron, enzalutamid osv.) administrert som et enkelt legemiddel eller i kombinasjon med kjemoterapeutika.

I kliniske forsøk som viser den prognostiske verdien av sirkulerende tumorceller (CTC) identifisert og karakterisert ved hjelp av AdnaTest immunmagnetiske kuler, ble det ikke observert noen negativ interferens fra kjemoterapeutika, målrettet behandling eller antihormonell behandling, forutsatt at venteperioden på minst 7 dager etter administrering av stoffet ble overholdt. En negativ effekt av vanlige medisiner som tas i tillegg (acetylsalisylsyre, ibuprofen, aprepitant, steroider osv.), er usannsynlig, men blir overvåket.

## Interfererende betingelser

### Blodkoagulering

I forbindelse med kliniske forsøk observert vi blodkoagulering etter inkubasjon med AdnaTest immunmagnetiske kuler – oftest i blodprøver fra pasienter i en svært fremskreden sykdomsfase. Blodprøver med koagel er vanskelige å behandle under AdnaTest-arbeidsflyten på grunn av økt viskositet, og de er vanskelige å pipettere. De inneholder også et uakseptabelt høyt antall kontaminerende leukocytter, noe som fører til falskt positive resultater. Slike prøver må kastes.

## Benign organisk sykdom og kroniske betennelsestilstander

Benign organisk sykdom og kronisk betennelse, for eksempel artritt, benign prostatahyperplasi (BPH), Crohns sykdom osv., fører ikke til falskt positive AdnaTest-resultater.

## Akutt allergi

Ved akutte allergiske tilstander er det et økt antall kontaminerende leukocytter etter CTC-anrikelse ved hjelp av AdnaTest immunmagnetiske kuler. Derfor kan ikke falskt positive resultater utelukkes helt.

## Kliniske studier

Blodprøver ble analysert fra 18 pasienter med metastatisk tykktarmskreft før behandling og i tidlig fase av behandlingen for å kunne sammenligne kliniske CT-data (innhentet 3 måneder etter behandlingsstart) med AdnaTest-resultater. Samlet CTC-positivitet før behandling var 67 % (12/18). Av disse 12 pasientene var det 4 som ikke responderte på behandlingen, 2 viste stabil sykdom og 6 responderte (delvis remisjon). CTC ble værende hos 75 % av de som ikke responderte, men forsvant i løpet av tidlig fase av behandlingen hos 100 % av gruppen som responderte. Disse funnene tyder på at CTC-analyse i metastatisk tykktarmskreft er en tidlig indikator på behandlingsrespons. (Lankiewicz et al. 2008).

## Referanse

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.

# Forkortelser

AdnaMag-L	Konsentrator for magnetiske partikler (Large)
AdnaMag-S	Konsentrator for magnetiske partikler (Small)
bp	Basepar
C+	Positiv kontroll
C-	Negativ kontroll
cDNA	Komplementær deoksyribonukleinsyre
CEA	Karsinoembryonalt antigen
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dNTP-er	Deoksynukleotidtrifosfater
EGFR	Epidermal vekstfaktorreseptor
GA733-2	Gastrointestinal tumorassosiert antigen 733-2
kb	kilobaser
mRNA	Budbringer-ribonukleinsyre
PCR	Polymerasekjedereaksjon
RNase	Ribonuklease
o/min	Omdreininger per minutt
RT	Revers transkripsjon

# Symboler



Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til <N> tester



Brukes innen



Temperaturbegrensning



Katalognummer



Se bruksanvisningen



Produsent



Medisinsk utstyr for in vitro-diagnostikk



Materialnummer



Globalt artikkelnummer



# Bestillingsinformasjon

Produkt	Innhold	Katalognr
AdnaTest ColonCancerSelect	For isolasjon av CTC-er og påfølgende ekstraksjon av mRNA fra humant fullblod for 12 klargjøringer	395422
AdnaTest ColonCancerDetect	RT-PCR-sett for påvisning av tykktarmskreft-assosiert genekspressjon i anrikede tumorceller	396422
<b>Tilknyttede produkter</b>		
AdnaTube	12 prøverør som inneholder EDTA. Skal kun brukes med antikoagulert blod som er tatt i A-CDA-blodprøverør fra BD	399932
AdnaMag-L	For 8 rør, 1,5 ml	399921
AdnaMag-S	For 8 rør, 1,5 ml	399911
Sensiscript RT Kit (50)	For 50 revers transkripsjon-reaksjoner: * Sensiscript revers transkriptase, 150 µl 10x buffer RT, 100 µl dNTP Mix (inneholder 5 mM hver dNTP), 1,1 ml RNase-fritt vann	205211
HotStarTaq Master Mix Kit (250 U)	3 x 0,85 ml HotStarTaq Master Mix (inneholder 250 enheter HotStarTaq DNA-polymerase, PCR-buffer med 3 mM MgCl <sub>2</sub> og 400 µM av hver dNTP) og 2 x 1,7 ml RNase-fritt vann	203443

\* Sensiscript RT-settet (50) rekker kun til 25 prøver med AdnaTest ColonCancerDetect fordi det kreves dobbelt volum for hver reaksjon.

Hvis du ønsker oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfraskrivelser, kan du se i den aktuelle håndboken for QIAGEN-settet eller i bruksanvisningen. Håndbøker og bruksanvisninger for QIAGEN-sett er tilgjengelige på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) eller kan leveres fra QIAGENS tekniske tjenester eller den lokale distributøren.

#### **Begrenset lisensavtale for AdnaTest ColonCancerSelect og AdnaTest ColonCancerDetect**

Bruk av dette produktet innebærer at enhver kjøper eller bruker av produktet samtykker i følgende vilkår:

1. Produktet kan bare brukes i samsvar med protokollene som leveres med produktet og denne håndboken, og skal bare brukes med komponenter som er inkludert i settet. QIAGEN gir ingen lisens i forhold til noen av sine årsprodukter til å bruke eller innlemme komponenter i dette settet med andre komponenter som ikke er inkludert i dette settet, med unntak av det som er beskrevet i protokollene som leveres med produktet, denne håndboken og andre protokoller som er tilgjengelige på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Noen av disse andre kontrollene er utarbeidet av QIAGEN-brukere for QIAGEN-brukere. Disse protokollene er ikke blitt grundig testet eller optimalisert av QIAGEN. QIAGEN garanterer ikke for dem, og gir heller ingen garanti for at de ikke krenker rettighetene til tredjeparter.
2. QIAGEN gir ingen garanti for at dette settet og/eller bruk av det ikke krenker rettighetene til tredjeparter, bortsett fra uttrykkelig oppgitte lisenser.
3. Dette settet og komponentene i det er lisensiert for engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
4. QIAGEN frasier seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller antydning, bortsett fra de som er uttrykkelig oppgitt.
5. Kjøperen og brukeren av settet samtykker i at de ikke skal gjøre eller la noen andre gjøre noe som kan resultere i eller fremme handlinger som er forbudt ovenfor. QIAGEN kan håndheve forbud i denne begrensede lisensavtalen i en hvilken som helst domstol, og skal få tilbake alle sine etterforsknings- og domstolskostnader, inkludert advokathonorarer, knyttet til enhver handling som iverksettes for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller eventuelle immaterielle rettigheter forbundet med settet og/eller komponentene.

Oppdaterte lisensvilkår er tilgjengelige på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Varemerker: QIAGEN<sup>®</sup>, Sample to Insight<sup>®</sup>, HotStarTaq<sup>®</sup>, Sensiscript<sup>®</sup> (QIAGEN Group); Agilent<sup>®</sup> (Agilent Technologies, Inc.); ERBITUX<sup>®</sup> (ImClone LLC., et heleid datterselskap av Eli Lilly and Company); Herceptin<sup>®</sup> (Genentech, Inc.); IRESSA<sup>®</sup> (AstraZeneca Group) LabChip<sup>®</sup> (Caliper Life Sciences, Inc.); Sarstedt<sup>®</sup>, S-Monovette<sup>®</sup> (Sarstedt AG and Co.); Vacutainer<sup>®</sup> (Becton Dickinson and Company).

HB-2343-001 © 2017 QIAGEN. Med enerett.

---

Denne siden skal være tom

---

Bestilling [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Teknisk støtte [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Nettside [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)