

2017 m. kovas

„AdnaTest ProstateCancerSelect“ ir „ProstateCancerDetect“ vadovas



12 (katalogo numeris 395432)



12 (katalogo numeris 396432)

Skirtas auglio ląstelėms, gautoms iš prostatos vėžiu sergančių pacientų kraujo, gausinti ir su prostatos vėžiu susijusiai genų ekspresijai pagausintose auglio ląstelėse aptikti

Skirta „in vitro“ diagnostikai

1 versija



395432 („AdnaTest ProstateCancerSelect“)

396432 („AdnaTest ProstateCancerDetect“)



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, VOKIETIJA



1106692LT

Sample to Insight



Turinys

Numatytoji paskirtis	4
Santrauka ir paaiškinimas	4
Procedūros principas.....	5
AdnaTest ProstateCancerSelect	5
AdnaTest ProstateCancerDetect.....	6
Pateiktos medžiagos	7
Rinkinio turinys.....	7
Reikalingos, tačiau nepateikiamos medžiagos	9
AdnaTest ProstateCancerSelect	9
AdnaTest ProstateCancerDetect.....	10
Įspėjimai ir atsargumo priemonės.....	11
Saugos informacija.....	11
Naudojimo informacija.....	11
Patentai	11
Reagentų laikymas ir naudojimas.....	12
Laikymas	12
Apdorojimas	12
Bandinio naudojimas ir laikymas	13
Mėginio paruošimas	13
Protokolas: Auglio ląstelių pagausinimas naudojant „AdnaTest ProstateCancerSelect“	14
Protokolas: su prostatos vėžiu susijusios genų ekspresijos pagausintose auglio ląstelėse aptikimas naudojant „AdnaTest ProstateCancerDetect“	18

Protokolas: sudėtinė ir pavienė PGR.....	23
Rezultatų aiškinimas.....	26
Fragmentų analizė „Agilent 2100“ bioanalizatoriumi	26
Trikčių šalinimo vadovas	30
Kokybės kontrolė	30
Apribojimai.....	30
Veikimo charakteristikos.....	31
Atkūrimas	31
Specifiškumas	31
Rezultatų atkartojamumas.....	32
Tikslumas	32
Trukdančios medžiagos	32
Trukdančios sąlygos	34
Klinikiniai tyrimai.....	35
Literatūra	35
Santrumpos	35
Simboliai.....	37
Užsakymo informacija	38

Numatytoji paskirtis

„AdnaTest ProstateCancerSelect“ – tai „in vitro“ diagnostinis metodas, skirtas cirkuliuojančioms auglio ląstelėms, gautoms iš antikoaguliuotų viso kraujo mėginių, surinktų iš prostatos vėžiu sergančių pacientų, gausinti naudojant epitelinių ir su augliu susijusių antigenų derinį.

„AdnaTest ProstateCancerDetect“ – tai „in vitro“ diagnostinis tyrimas, skirtas auglio ląstelių ekspresijos profilių analizei, naudojant atvirkštinę transkripciją ir sudėtinę PGR, ir vėlesnei densitometrinei PGR produktų analizei, naudojant automatizuotą kapiliarų elektroforezę „Agilent® 2100“ bioanalizatoriumi.

„AdnaTest ProstateCancerSelect/Detect“ neskirtas naudoti atrankinės patikros tikslais ir neturi būti naudojamas kaip diagnostinis tyrimas norint patvirtinti prostatos vėžį.

Šis gaminytis skirtas naudoti tik profesionalams, pavyzdžiui, technikams ir gydytojams, susipažinusiems su molekulinės biologijos metodais.

Santrauka ir paaiškinimas

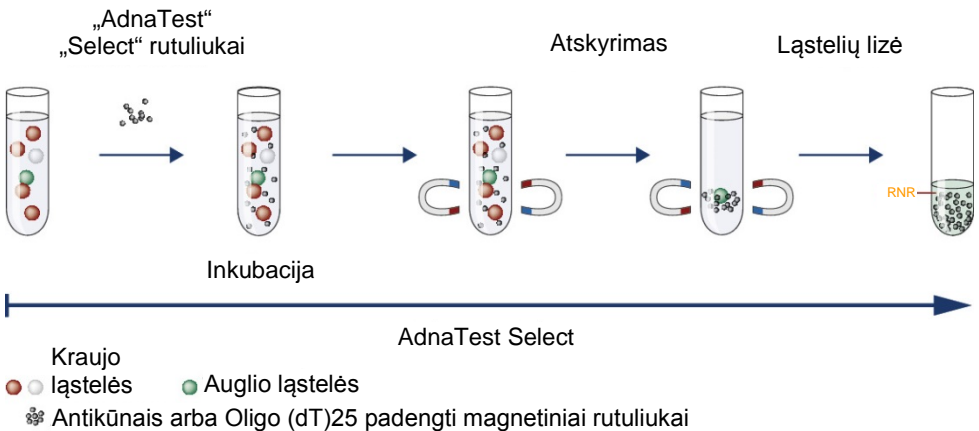
Naudojant „AdnaTest ProstateCancerSelect“ galima atlikti auglio ląstelių imunomagnetinį gausinimą naudojant epitelinius ir su augliu susijusius antigenus. „AdnaTest ProstateCancerDetect“ naudojamas su prostatos vėžiu susijusios genų ekspresijos imunomagnetiškai pagausintose vėžio ląstelėse analizei naudojant atvirkštinę transkripciją ir PGR.

Procedūros principas

AdnaTest ProstateCancerSelect

Epitelių ir su augliu susijusių antigenų antikūnai sujungiami su magnetiniais rutuliukais, kad visame kraujyje būtų pažymėtos auglio ląstelės. Pažymėtos ląstelės išskiriamos naudojant magnetinių dalelių koncentratorių (AdnaMag-L ir AdnaMag-S), tada lizuojamos (1 pav.).

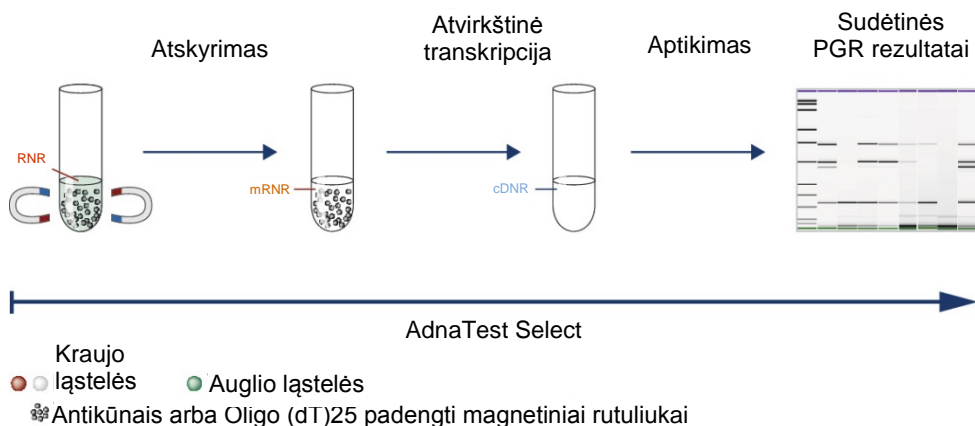
Ląstelių lizatas naudojamas tolesnei analizei naudojant „AdnaTest ProstateCancerDetect“.



1 pav. „AdnaTest ProstateCancerSelect“: imunomagnetinis ląstelių atrinkimas naudojant su augliu susijusius antikūnus. Pirmajame etape kraujyje esančios CTC pagausinamos („AdnaTest Select“). Tai pasiekama naudojant antikūnais padengtas magnetines daleles (rutuliukus). Naudojami keli antikūnai, kurie su dideliu specifiskumu stipriai prisijungia prie atitinkamų vėžio ląstelių. Pagausintos ląstelės lizuojamos, tada kelis kartus gryninamos, kad būtų išgauta mRNR.

AdnaTest ProstateCancerDetect

„AdnaTest ProstateCancerDetect“ rinkinyje yra Oligo (dT)₂₅ rutuliukų, skirtų mRNR išskirti naudojant iš anksto pagausintų auglio ląstelių lizatą. Atlikus atvirkštinę transkripciją gaunama cDNR, kuri naudojama kaip auglio ląstelių aptikimo ir charakterizavimo naudojant sudėtinę PGR, matrica. Naudojant „AdnaTest PrimerMix ProstateDetect“ galima amplifikuoti tris su augliu susijusius antigenus ir vieną kontrolinį geną. Naudojant „AdnaTest PrimerMix AR-Detect“ galima amplifikuoti androgeno receptorių (AR).



2 pav. „AdnaTest ProstateCancerDetect“: įvairių su augliu susijusių žymenų sudėtinė PGR. Antrame etape, naudojant RT-PGR, pagausintos ląstelės tiriamos, ar nėra su augliu susijusių ekspresijos modelių. mRNR gijos atvirkštine tvarka transkribuojamos į cDNR. Tuomet, naudojant sudėtinę PGR, gali būti amplifikuoti ir vizualizuoti keli su augliu susiję žymenys.

Du „AdnaTest PrimerMixes“ generuoja šiuos fragmentus:

PrimerMix ProstateDetect

- PSMA: 449 bp
- PSA: 357 bp

- EGFR: 163 bp
- Aktinas: 120 bp (vidinė PGR kontrolinė medžiaga)

PrimerMix AR-Detect

- AR: 440 bp

Pastaba: fragmentų dydžiai gali šiek tiek skirtis. Aptiktiems signalams priskirti naudokite „AdnaTest“ teigiamas kontrolines medžiagas.

Pateiktos medžiagos

Rinkinio turinys

AdnaTest ProstateCancerSelect			
Tyrimų skaičius		12	
Katalogo numeris		395432	
Surinkimo mėgintuvėliai	Collection Tubes (surinkimo mėgintuvėliai (15 ml))	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	3 x 5
Surinkimo mėgintuvėliai	Collection Tubes (surinkimo mėgintuvėliai (1,5 ml))	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	24
Raudona	„ProstateSelect Beads“ („ProstateSelect“ rutuliukai)	PSB	1,2 ml
Raudona	„AdnaTest Lysis/Binding Buffer“ („AdnaTest“ lizės / susiejimo buferinis tirpalas)	LBB	2 x 1,2 ml
	Vadovas		1

AdnaTest ProstateCancerDetect			
Katalogo Nr.	396432		
Tyrimų skaičius	12		
„AdnaTest“ RNR reagentai			1 dėžutė
Raudona	„AdnaTest Lysis/Binding Buffer“ („AdnaTest“ lizės / susiejimo buferinis tirpalas)	LBB	2 ml
Oranžinė	„Oligo(dT)25 Beads“ (Oligo (dT)25 rutuliukai)	OdT	280 µl
Balta	„RNA Purification Buffer A“ (RNR gryninimo buferinis tirpalas A)	BA	4 ml
Balta	„RNA Purification Buffer B“ (RNR gryninimo buferinis tirpalas B)	BB	4 ml
Violetinė	„Tris-HCL Buffer“ („Tris-HCL“ buferinis tirpalas)	TB	2 ml
AdnaTest ProstateCancerDetect			2 dėžutė
Mėlyna	„AdnaTest PrimerMix ProstateDetect“ (pradmenų mišinys „AdnaTest PrimerMix ProstateDetect“)	PMP	144 µl
Oranžinė	„Adna Test Positive Control Prostate (C+)“ („AdnaTest“ prostatos teigiama kontrolinė medžiaga (C+))	CONTROL +	40 µl
Geltona	AdnaTest PrimerMix AR-Detect	PMA	144 µl
Rožinė	„AdnaTest Positive Control AR (C+)“ („AdnaTest“ teigiama kontrolinė medžiaga AR (C+))	CONTROL +	40 µl
Vadovas			1

„AdnaTest ProstateCancerDetect“ reagentų pakanka 6 PGR kontrolinėms medžiagoms ir 12 kraujo mėginių išanalizuoti.

Reikalingos, tačiau nepateikiamos medžiagos

Dirbdami su cheminėmis medžiagomis būtina dėvėti tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir užsidėkite apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose saugos duomenų lapuose (safety data sheets, SDS), kuriuos gali pateikti produkto tiekėjas.

AdnaTest ProstateCancerSelect

Įranga

- Mėgintuvėlių rotorius, skirtas 15 ml ir 1,5 ml mėgintuvėliams (pvz., ELMI Ltd., kat. nr. IMIX-03)
- Magnetinių dalelių koncentratoriai
 - „AdnaMag-L“ (kat. nr. 399921)
 - „AdnaMag-S“ (kat. nr. 399911)

Medžiagos

- „AdnaTube Tubes“ („AdnaTube“ mėgintuvėliai) (kat. nr. 399932), kai naudojami „BD Vacutainer® ACD-A“ mėgintuvėliai
- Sterilios be RNazės 10 ml stiklinės arba plastikinės pipetės ir automatinės pipetės
- „Sterile, RNase-free 1.5 ml reaction tubes“ (sterilūs be RNazės 1,5 ml reakcijų mėgintuvėliai) (pvz., „Sarstedt“, kat. nr. 72.690)
- Pipetės ir pipečių antgaliai be RNazės su aerozoliniais barjeriais, tinkami 100–1 000 µl tūriui lašinti

Reagentai

- „Phosphate buffered saline (PBS)“ (fosfato buferinis fiziologinis tirpalas (PBS), pH 7,0–7,3 (pvz., „Fisher“, kat. nr. VX14190169, D-PBS)

AdnaTest ProstateCancerDetect

Įranga

- „Tube rotator for 1.5 ml tubes“ (mėgintuvėlių rotorius, skirtas 1,5 ml mėgintuvėliams) (pvz., ELMI Ltd., kat. nr. IMIX-03)
- „Magnetic particle concentrator AdnaMag-S“ (magnetinių dalelių koncentratorius „AdnaMag-S“) (kat. nr. 399911)
- Šiluminis blokas arba vandens vonelė (65°C)
- Šiluminio ciklo prietaisas su šildomu dangteliu, šildymo greitis 2 °C/s.
- „Agilent 2100“ bioanalizatorius („Agilent Technologies“)

Medžiagos

- Sterilūs be RNazės plonasieniai 0,2 ml PGR mėgintuvėliai
- „Sterile, RNase-free 1.5 ml reaction tubes“ (sterilūs be RNazės 1,5 ml reakcijų mėgintuvėliai) (pvz., „Sarstedt“, kat. nr. 72.690)
- Pipetės ir pipečių antgaliai be RNazės su aerozoliniais barjeriais, tinkami 1–200 µl tūriui lašinti

Reagentai

- „Sensiscript® RT Kit“ („Sensiscript® RT“ rinkinys (QIAGEN, kat. nr. 205211, 50 reakcijų)
 - **Pastaba:** „Sensiscript RT Kit“ („Sensiscript RT“ rinkinio) (kat. nr. 205211) užteks tik 25 mėginiams, nes kiekvienai reakcijai reikia dvigubo tūrio.
- „Recombinant RNasin, RNase-inhibitor, 2500 U“ (rekombinantinis „RNasin“, RNazės inhibitorius 2 500 U) („Promega“, kat. nr. N2511)
- „HotStarTaq® Master Mix Kit“ („HotStarTaq®“ pagrindinio mišinio rinkinys) (QIAGEN, kat. nr. 203443, 250 U)
- Skaldytas ledas

Įspėjimai ir atsargumo priemonės

Skirta „in vitro“ diagnostikai

Saugos informacija

Dirbdami su cheminėmis medžiagomis būtinai dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir užsidėkite apsauginius akinius. Daugiau informacijos rasite atitinkamuose saugos duomenų lapuose (SDS). Jie pateikiami patogiu ir kompaktišku PDF formatu internete www.qiagen.com/safety – čia galite rasti, peržiūrėti ir išspausdinti kiekvieno QIAGEN rinkinio ir jų komponentų SDS.

Mėginių ir tyrimų atliekas išmeskite laikydamiesi vietinių saugos reikalavimų.

Naudojimo informacija

Šiuos tyrimus turi atlikti molekulinės biologijos metodus išmanantys darbuotojai.

Patentai

„AdnaTest ProstateCancerDetect“ testui reikalingos „Hoffmann-La Roche AG“, Bazelyje, licencijos. Įsigijus „AdnaTest ProstateCancerDetect“, naudotojui nesuteikiama teisė atlikti PGR be licencijos.

Reagentų laikymas ir naudojimas

Laikymas

„AdnaTest ProstateCancer“ sistema pateikiama trijose dėžutėse. „AdnaTest ProstateCancerSelect“ (kat. nr. 395432) ir „AdnaTest RNA Reagent Box 1“ („AdnaTest“ reagentų 1 dėžutė) (1 dėžutės kat. nr. 396432) turi būti laikomi 2–8 °C temperatūroje. Komponentų negalima naudoti pasibaigus tinkamumo laikui.

„AdnaTest ProstateCancerDetect Box 2“ („AdnaTest ProstateCancerDetect“ 2 dėžutė) (2 dėžutės kat. nr. 396432), kurioje yra „AdnaTest PrimerMixes“ ir „AdnaTest“ teigiamos kontrolinės medžiagos, turi būti laikoma atskirai nuo –30 iki –15 °C temperatūroje. Norėdami išvengti galimo užteršimo ir pasikartojančių temperatūros pokyčių, pradmenų mišinį padalykite į alikvotines dalis. Komponentų negalima naudoti pasibaigus tinkamumo laikui.

Apdorojimas

- „ProstateSelect“ rutuliukuose yra konservanto natrio azido. Natrio azidas yra citotoksinis, todėl prieš naudojant rutuliukus jį reikia pašalinti. (Žr. „Protokolas: Auglio ląstelių pagausinimas naudojant „AdnaTest ProstateCancerSelect““, 14 psl.)
- Visi komponentai ir papildomi reagentai, pateikti kitų tiekėjų, turi būti laikomi pagal jų instrukcijas. Atkreipkite dėmesį į atitinkamų gamintojų pateiktą saugos informaciją.
- Dėvėkite apsaugines pirštines, kad išvengtumėte užteršimo DNR, RNR ir RNazėmis.
- „ProstateSelect“ rutuliukus padalykite į alikvotines dalis, kad išvengtumėte užteršimo.
- Tyrimą reikia atlikti nurodyta seka laikantis visų inkubavimo laiko ir inkubavimo temperatūros atžvilgiu nurodytų specifikacijų.
- Jei atliekant ląstelių gausinimą atrinkimo rutuliukai sulimpa, mėginius išmeskite.

- Jei įmanoma, mėginius apdorokite, įskaitant atvirkštinę transkripciją ir vėlesnę analizę, skirtingose patalpose, kad būtų išvengta kryžminio užteršimo.
- Naudojant ne siūlomų, o kitų tiekėjų produktus, gali būti gauti prastesni rezultatai.
- Laikykitės laboratorijos saugos ir higienos reikalavimų (pvz., dėvėkite laboratorinius chalatus, mūvėkite pirštines ir užsidėkite apsauginius akinius).

Bandinio naudojimas ir laikymas

Mėginio paruošimas

- Kraujo mėginiai turi būti paimti prieš naudojant terapines medžiagas. „AdnaTest ProstateCancerSelect“ naudokite tik po paskutinės terapinės intervencijos praėjus bent 7 dienoms!
- Kraujo surinkimas: jei mėginiai bus transportuojami trumpiau nei 4 valandas, naudokite mėgintuvėlius su EDTA kaip antikoagulantu (pvz., „S Monovette® K3 EDTA“, „Sarstedt“ [kat. nr. 01.1605.001]) ir surinkite bent 7,5 ml viso kraujo.
- Jei mėginiai bus transportuojami ilgiau nei 4 valandas, naudokite „Vacutainer ACD-A Tubes“ („BD Vacutainer ACD-A“ mėgintuvėlius) („Becton Dickinson GmbH“, kat. nr. 366645 [ES]; 364606 [JAV]) ir surinkite bent 8,5 ml viso kraujo. Prieš tolesnį apdorojimą naudojant „AdnaTest“, 5 ml ACD-A kraujas turi būti perkeltas į „AdnaTube Sample Tube“ („AdnaTube“ mėginių mėgintuvėlių), kat. nr. 399932.
- Kraujas iš karto turi būti laikomas 4–8 °C temperatūroje.
- Mėginius reikia apdoroti kuo greičiau, bet ne vėliau kaip per 4 val. po kraujo paėmimo, kai naudojami įprasti EDTA mėgintuvėliai, arba per 30 val., kai kartu su „AdnaTubes“ naudojami „BD Vacutainer“ kraujo surinkimo mėgintuvėliai.
- Kraujo mėginiai negali būti hemolizuoti.

Protokolas: Auglio ląstelių pagausinimas naudojant „AdnaTest ProstateCancerSelect“

Svarbi informacija prieš pradedant

- Prieš pradėdami procedūrą, perskaitykite „Ispėjimai ir atsargumo priemonės“ (11 psl.), „Reagentų laikymas ir naudojimas“ (12 psl.) ir „Bandinio naudojimas ir laikymas“ (13 psl.).
- Prieš naudojant „ProstateSelect“ rutuliukus būtina juos nuplauti, kaip aprašyta toliau esančiame skyriuje „Procedūra A: „ProstateSelect“ rutuliukų paruošimas“, kad būtų pašalintas natrio azidas.
- Pateiktus 1,5 ml surinkimo mėgintuvėlius naudokite tik nurodytame protokolo etape.

Ką reikia atlikti prieš pradedant

- Įsitinkite, kad „AdnaTest“ lizės / susiejimo buferinis tirpalas atšildytas iki kambario temperatūros. Jei matote nuosėdų, atšildykite reagentą iki kambario temperatūros ir išmaišykite, kol nuosėdos visiškai ištirps.

Procedūra A: „ProstateSelect“ rutuliukų paruošimas

1. Kruopščiai išmaišykite „ProstateSelect“ rutuliukus įsiurbdami ir lašindami pipete, nepurtykite!
2. Apskaičiuokite „ProstateSelect“ rutuliukų tūrį, reikalingą visiems mėginiams apdoroti (100 µl vienam mėginiui), ir perpilkite apskaičiuotą tūrį į 1,5 ml reakcijų mėgintuvėlį (nepateikiamas).

Jei apdorojama daugiau kaip 10 mėginių, naudokite papildomus 1,5 ml reakcijų mėgintuvėlius (nepateikiami).

3. Įstatykite mėgintuvėlį į „AdnaMag-S“.
4. Po 1 minutės išsiurbkite supernatantą pipete.

Pastaba: išsiurbdami supernatantą nelieskite rutuliukų!

5. Plovimo veiksmai:

- 5a. Iš „AdnaMag-S“ išimkite magnetų slankiklį.
 - 5b. Įlašinkite 1 ml PBS ir kelis kartus pipete įsiurbdami ir lašindami išmaišykite rutuliukus.
 - 5c. Įstatykite magnetų slankiklį į AdnaMag-S.
 - 5d. Po 1 minutės visiškai išsiurbkite supernatantą pipete.
 - 5e. Kartokite 5a ir 5d veiksmus dukart (iš viso trys plovimai).
6. Išimkite mėgintuvėlį iš „AdnaMag-S“ ir išmaišykite rutuliukus PBS, kad būtų gautas pradinis tūris (100 µl vienam mėginiui). Tęskite vadovaudamiesi toliau pateiktu skyriumi „Procedūra B: auglio ląstelių pasirinkimas“.

Procedūra B: auglio ląstelių pasirinkimas

1. Jei naudojate standartinius EDTA mėgintuvėlius, pipete įlašinkite 5 ml kraujo mėginio į 15 ml surinkimo mėgintuvėlį.
Jei naudojate ACD-A kraują „BD Vacutainer ACD-A“ mėgintuvėlyje, perkelti 5 ml kraujo į „AdnaTube“.

Pastaba: naudojant „BD Vacutainer ACD-A“ mėgintuvėlius, „AdnaTubes“ yra privalomi.

2. Įsiurbdami ir lašindami pipete kruopščiai išmaišykite „ProstateSelect“ rutuliukus (paruoštus atliekant A procedūros 6 veiksmą) ir įlašinkite po 100 µl šių rutuliukų į kiekvieną kraujo mėginį.
3. Prietaise lėtai (maždaug 5 aps./min.) sukite mėgintuvėlius kambario temperatūroje 30 minučių, leisdami pakreipti ir sukti.
4. Įstatykite mėgintuvėlius į „AdnaMag-L“ be magnetų slankiklio. Pakreipkite „AdnaMag-L“ žemyn, kad ištekėtų į dangtelį patekę kraujo lašeliai.
5. Įstatykite magnetų slankiklį ir inkubuokite mėgintuvėlius „AdnaMag-L“ kambario temperatūroje 3 minutes.
6. 10 ml pipete visiškai išsiurbkite supernatantą neliesdami rutuliukų.

Pastaba: išsiurbdami supernatantą nelieskite rutuliukų!

7. Plovimo veiksmai:

- 7a. Iš „AdnaMag-L“ išimkite magnetų slankiklį.
 - 7b. Įlašinkite 5 ml PBS. Uždarykite mėgintuvėlius ir atsargiai papurtykite „AdnaMag-L“ pirmyn atgal 5 kartus, kad išsimašytų magnetinių rutuliukų / ląstelių kompleksai.
 - 7c. Dukart pakreipkite „AdnaMag-L“ su mėgintuvėliais žemyn, kad ištekėtų į dangtelį patekę lašeliai.
 - 7d. Į „AdnaMag-L“ įstatykite magnetų slankiklį ir inkubuokite kambario temperatūroje 1 minutę.
 - 7e. Pipete visiškai išsiurbkite supernatantą.
 - 7f. Kartokite 7a ir 7e veiksmus dukart (iš viso trys plovimai).
8. Iš „AdnaMag-L“ išimkite magnetų slankiklį.
9. Išmaišykite magnetinių rutuliukų / ląstelių kompleksus 1 ml PBS ir perkelkite kiekvieną mėginį į 1,5 ml reakcijų mėgintuvėlį (nepateikiamas).
10. Įstatykite reakcijų mėgintuvėlius į „AdnaMag-S“ su įdėtu magnetų slankikliu.
- Pastaba:** „AdnaMag-S“ magnetų slankiklį galima įstatyti naudojant dvi padėtis. Slankiklį visada įstatykite taip, kad balta plastikinė plėvelė būtų nukreipta į priekį ir magnetai būtų šalia reakcijų mėgintuvėlių.
11. Po 1 minutės pipete visiškai išsiurbkite supernatantą, kad būtų optimizuota ląstelių lizė.
12. Iš „AdnaMag-S“ išimkite magnetų slankiklį.
13. Į kiekvieną reakcijų mėgintuvėlį įlašinkite 200 µl „AdnaTest“ lizės / susiejimo buferinio tirpalo (atšildyto iki kambario temperatūros). Išmaišykite įsiurbdami ir lašindami pipete bent penkis kartus.
14. Į „AdnaMag-S“ įstatykite magnetų slankiklį ir inkubuokite 1 minutę.
15. Perkelkite supernatantą (ląstelių lizatą) į naujus 1,5 ml reakcijų mėgintuvėlius (pateikiami).
16. Išmeskite mėgintuvėlius su rutuliukais.
17. Iš karto tęskite atlikdami mRNR išskyrimą (žr. „Protokolas: su prostatos vėžiu susijusios genų ekspresijos pagausintose auglio ląstelėse aptikimas naudojant „AdnaTest“

ProstateCancerDetect™, 18 psl.) arba ląstelių lizatus laikykite –20 °C temperatūroje ilgiausiai 2 savaites.

Protokolas: su prostatos vėžiu susijusios genų ekspresijos pagausintose auglio ląstelėse aptikimas naudojant „AdnaTest ProstateCancerDetect“

Svarbi informacija prieš pradėdant

- Prieš pradėdami procedūrą, perskaitykite „Išpėjimai ir atsargumo priemonės“ (11 psl.) ir „Reagentų laikymas ir naudojimas“ (12 psl.).
- Procedūrose A–C aprašomas mRNR išskyrimas ir atvirkštinė transkripcija.
- Pateiktus 1,5 ml surinkimo mėgintuvėlius naudokite tik nurodytame protokolo etape.

Ką reikia atlikti prieš pradėdant

- Įsitikinkite, kad „AdnaTest“ lizės / susiejimo buferinis tirpalas atšildytas iki kambario temperatūros. Jei matote nuosėdų, atšildykite reagentą iki kambario temperatūros ir išmaišykite, kol nuosėdos visiškai ištirps.
- Atšildykite RNR gryninimo buferinį tirpalą A ir RNR gryninimo buferinį tirpalą B iki kambario temperatūros. Padėkite „Tris-HCL“ buferinį tirpalą ant ledo.
- Kambario temperatūroje atšildykite 10x buferinio tirpalo RT ir dNTPs iš „Sensiscript RT“ rinkinio. Purtydami sumaišykite. Trumpai centrifuguokite ir laikykite ant ledo. Atšildykite vandenį be RNazės („Sensiscript RT“ rinkinio dalis).
- Sureguliuokite, kad šiluminio bloko arba vandens vonelės temperatūra būtų 65°C.

Procedūra A: Oligo (dT)₂₅ rutuliukų paruošimas

1. Prieš naudodami kruopščiai išmaišykite Oligo(dT)₂₅ rutuliukus įsiurbdami ir lašindami pipete, nepurtykite!
2. Apskaičiuokite rutuliukų tūrį, reikalingą visiems mėginiams apdoroti (20 µl vienam mėginiui pridodant 10%), ir perpilkite apskaičiuotą tūrį į 1,5 ml reakcijų mėgintuvėlį be RNazės (nepateikiamas).
3. Įstatykite mėgintuvėlį į „AdnaMag-S“.

Pastaba: „AdnaMag-S“ magnetų slankiklį galima įstatyti naudojant dvi padėtis. Slankiklį visada įstatykite taip, kad balta plastikinė plėvelė būtų nukreipta į priekį ir magnetai būtų šalia reakcijų mėgintuvėlių.

4. Po 1 minutės išsiurbkite supernatantą pipete.
5. Plovimo veiksmai:
 - 5a. Iš „AdnaMag-S“ išimkite magnetų slankiklį.
 - 5b. Įlašinkite pradinį (2 veiksmas, 19 psl.) „AdnaTest“ lizės / susiejimo buferinio tirpalo tūrį ir kelis kartus pipete įsiurbdami ir lašindami išmaišykite rutuliukus. Maišykite atsargiai, kad nesusidarytų putų.
 - 5c. Įstatykite magnetų slankiklį į „AdnaMag-S“.
 - 5d. Po 1 minutės visiškai išsiurbkite supernatantą.
 - 5e. Kartokite 5a ir 5d veiksmus vieną kartą (iš viso du plovimai).
6. Išimkite mėgintuvėlį iš „AdnaMag-S“ ir išmaišykite rutuliukus „AdnaTest“ lizės / susiejimo buferiniame tirpale, kad būtų gautas pradinis tūris (2 veiksmas, 19 psl.). Pereikite prie „Procedūra B: mRNR išskyrimas“.

Procedūra B: mRNR išskyrimas

1. Į kiekvieną mėgintuvėlį, kuriame yra ląstelių lizato, (15 veiksmas, 16 psl.) įlašinkite 20 µl Oligo(dT)₂₅ rutuliukų (anksčiau aprašytas 6 veiksmas).
2. Prietaise lėtai (maždaug 5 aps./min.) sukite mėgintuvėlius kambario temperatūroje 10 minučių, leisdami pakreipti ir sukti.
3. Įstatykite mėgintuvėlius į „AdnaMag-S“ be magnetų slankiklio. Pakreipkite „AdnaMag-S“ žemyn, kad ištekėtų į dangtelį patekę rutuliukai ir skystis.
4. Įstatykite magnetų slankiklį ir po 1 minutės išsiurbkite supernatantą.
5. Plovimo veiksmai 1:
 - 5a. Iš „AdnaMag-S“ išimkite magnetų slankiklį.
 - 5b. Į kiekvieną mėgintuvėlį įlašinkite 100 µl RNR gryninimo buferinio tirpalo A ir kelis kartus pipete įsiurbdami ir lašindami išmaišykite rutuliukus. kad nebūtų prarasta rutuliukų, kruopščiai išskalaukite dangtelį ir mėgintuvėlio sienelės.
 - 5c. Įstatykite magnetų slankiklį į „AdnaMag-S“.
 - 5d. Po 1 minutės visiškai išsiurbkite supernatantą.
 - 5e. Kartokite 5a ir 5d veiksmus vieną kartą (iš viso du plovimai).
6. Plovimo veiksmai 2:
 - 6a. Iš „AdnaMag-S“ išimkite magnetų slankiklį.
 - 6b. Į kiekvieną mėgintuvėlį įlašinkite 100 µl RNR gryninimo buferinio tirpalo B. Įsiurbdami ir lašindami išmaišykite rutuliukus ir perkelkite į naujus 1,5 ml reakcijų mėgintuvėlius (pateikiami).
 - 6c. Įstatykite magnetų slankiklį į „AdnaMag-S“.
 - 6d. Po 1 minutės visiškai išsiurbkite supernatantą. Šį veiksmą reikia atlikti atidžiai (stebėkite granulę), nes rutuliukai gali nuslysti ir būti netyčia pašalinti.
 - 6e. Kartokite 6a–6d veiksmus vieną kartą tuose pačiuose reakcijų mėgintuvėliuose (iš viso du plovimai).
7. Iš „AdnaMag-S“ išimkite magnetų slankiklį.

8. Į kiekvieną mėgintuvėlį įlašinkite 100 µl labai šalto „Tris-HCL“ buferinio tirpalo ir įsiurbdami ir lašindami pipete išmaišykite rutuliukus.
9. Įstatykite magnetų slankiklį į „AdnaMag-S“.
10. Po 1 minutės visiškai išsiurbkite supernatantą.
11. Iš „AdnaMag-S“ išimkite magnetų slankiklį.
12. Išmaišykite mRNR / rutuliukų kompleksą 14,75 µl vandens be RNazės.
13. Perkelkite mėgintuvėlius į šiluminį bloką arba vandens vonelę ir inkubuokite 5 minutes 65°C temperatūroje.
14. Mėgintuvėlius iš karto padėkite ant ledo bent 2 minutėms.
15. Iš karto (per 5 minutes) tęskite atlikdami atvirkštinę transkripciją (procedūra C: atvirkštinė transkripcija naudojant „Sensiscript RT“ rinkinį).
Nelaikykite mRNR / rutuliukų komplekso!

Procedūra C: atvirkštinė transkripcija naudojant „Sensiscript RT“ rinkinį

1. Paruoškite RT pagrindinį mišinį ant ledo. RT pagrindinis mišinys ruošiamas, kaip parodyta 1 lentelėje, atsižvelgiant į mėginių skaičių.
Pagrindinio mišinio tūris turi būti 10 % didesnis nei visoms atvirkštinės transkripcijos reakcijoms apskaičiuotas tūris. Visada reikia paruošti neigiamos kontrolės reakciją (RT kontrolinę medžiagą) nepridedant mRNR.
2. Papurtykite RT pagrindinį mišinį. Trumpai centrifuguokite ir kiekvienai reakcijai įlašinkite 5,25 µl į 0,2 ml PGR mėgintuvėlius.
3. Atsargiai pipete išmaišykite mRNR / rutuliukų kompleksus (12 veiksmas, 21 psl.).
Perkelkite visą tūrį į 0,2 ml PGR reakcijos mėgintuvėlį, kuriame yra RT pagrindinio mišinio. Kruopščiai išmaišykite kelis kartus įsiurbdami ir lašindami pipete.

1 lentelė. Atvirkštinės transkripcijos reakcijos nustatymas

Komponentas	Tūris
RT pagrindinis mišinys	
10x Buffer RT (10 x buferinis tirpalas RT)	2,0 µl
dNTP Mix (dNTP mišinys) (5 mM kiekvieno dNTP)	2,0 µl
RNase inhibitor (RNazės inhibitorius), 40 U/µl („Promega“)	0,25 µl
Sensiscript Reverse Transcriptase („Sensiscript“ atvirkštinė transkriptazė)	1,0 µl
RNR matrica* mRNA/bead complex or RNase free water mRNR / rutuliukų kompleksas arba vanduo be RNazės	14,75 µl
Bendras tūris	20,0 µl

* vietoj mRNR / rutuliukų komplekso įlašinkite 14,75 µl vandens be RNazės kaip RT kontrolinės medžiagos. mRNR / rutuliukų komplekso tūris gali šiek tiek skirtis. Bet kuriuo atveju atlikdami atvirkštinę transkripciją naudokite visą tūrį!

4. cDNR sintetinama šiluminio ciklo prietaise esant toliau nurodytoms sąlygoms (2 lentelė).

2 lentelė. Atvirkštinė transkripcijos programa

Temperatūra	Laikas
37 °C	60 minučių
93 °C	5 minutės
4 °C	∞

5. Padėkite reakcijų mėgintuvėlius su cDNR ant ledo arba laikykite –20 °C temperatūroje ilgiausiai 4 savaites. Pereikite prie „Protokolas: sudėtinė ir pavienė PGR“, 22 psl.

Protokolas: sudėtinė ir pavienė PGR

Svarbi informacija prieš pradėdant

- Prieš pradėdami procedūrą, perskaitykite „Įspėjimai ir atsargumo priemonės“ (11 psl.) ir „Reagentų laikymas ir naudojimas“ (12 psl.).

Ką reikia atlikti prieš pradėdant

- Atšildykite „HotStarTaq“ pagrindinį mišinį (QIAGEN), „AdnaTest PrimerMix ProstateDetect“, „AdnaTest“ prostatos teigiamą kontrolinę medžiagą, „AdnaTest PrimerMix AR-Detect“, „AdnaTest“ teigiamą kontrolinę medžiagą AR ir vandenį be RNazės. Papurtykite, greitai centrifuguokite ir laikykite ant ledo.

Procedūra A: sudėtinė PGR („AdnaTest ProstateDetect“)

1. PGR pagrindinis mišinys ruošiamas, kaip parodyta 3 lentelėje, atsižvelgiant į mėginių skaičių.

Skaičiuojant PGR pagrindinio mišinio tūrį reikia apimti bent 10 % papildomo tūrio. Atkreipkite dėmesį, kad visada turi būti įtraukta „AdnaTest“ prostatos teigiama kontrolinė medžiaga, vanduo be RNazės kaip neigiama kontrolinė medžiaga ir RT kontrolinė medžiaga.

2. Ruošdami į 0,2 ml PGR reakcijų mėgintuvėlius įlašinkite 21,0 µl pagrindinio mišinio. Įsiurbdami ir lašindami pipete išmaišykite cDNR / rutuliukų mišinį ir įlašinkite 4,0 µl šio mišinio į kiekvieną reakcijų mėgintuvėlį.

Pastaba: vietoj cDNR įlašinkite 4,0 µl vandens be RNazės kaip neigiamos kontrolinės medžiagos.

3 lentelė. Sudėtinės PGR paruošimas

Komponentas	Tūris
Sudėtinės PGR pagrindinis mišinys	
HotStarTaq Master Mix („HotStarTaq“ pagrindinis mišinys)	12,5 µl
RNase-free water (Vanduo be RNazės)	4,5 µl
PrimerMix ProstateDetect	4,0 µl
cDNR arba RT kontrolinė medžiaga, arba neigjama kontrolinė medžiaga (vanduo be RNazės), arba teigjama kontrolinė medžiaga (C+), kiekvienos:	4,0 µl
Bendrasis tūris	25,0 µl

3. Atliekant PGR, šiluminio ciklo prietaisas naudojamas pagal 4 lentelėje aprašytą programą. Naudokite šiluminio ciklo prietaisą esant 2 °C/sek. greičiui. PGR atliekama, iš viso naudojant 42 ciklus.

4 lentelė. PGR ciklų programa

	Temperatūra	Laikas
Pradinis aktyvinimo veiksmas	95 °C	15 min.
3 veiksmų ciklai		
Denatūracija:	94 °C	30 sek.
Prisijungimas:	61 °C	30 sek.
Išplėtimas:	72 °C	30 sek.
Ciklų skaičius:	42	
Galutinis išplėtimas:	72 °C	10 min.
Aušinimas:	4 °C	∞

Procedūra B: Pavienė PGR („AdnaTest AR-Detect“)

1. PGR pagrindinis mišinys ruošiamas, kaip parodyta 5 lentelėje, atsižvelgiant į mėginių skaičių.

Skaičiuojant PGR pagrindinio mišinio tūrį reikia apimti bent 10 % papildomo tūrio. Atkreipkite dėmesį, kad visada turi būti įtraukta „AdnaTest“ teigiama kontrolinė medžiaga, vanduo be RNazės kaip neigiama kontrolinė medžiaga ir RT kontrolinė medžiaga.

- Ruošdami į 0,2 ml PGR reakcijų mėgintuvėlius įlašinkite 21,0 µl pagrindinio mišinio. Įsiurbdami ir lašindami pipete išmaišykite cDNR / rutuliukų mišinį ir įlašinkite 4,0 µl šio mišinio į kiekvieną reakcijų mėgintuvėlį.

Pastaba: vietoj cDNR įlašinkite 4,0 µl vandens be RNazės kaip neigiamos kontrolinės medžiagos.

5 lentelė. Pavienės PGR paruošimas

Komponentas	Tūris
Pavienės PGR pagrindinis mišinys	
HotStarTaq Master Mix („HotStarTaq“ pagrindinis mišinys)	12,5 µl
RNase-free water (Vanduo be RNazės)	4,5 µl
PrimerMix AR-Detect	4,0 µl
cDNR arba RT kontrolinė medžiaga, arba neigiama kontrolinė medžiaga (vanduo be RNazės), arba teigiama kontrolinė medžiaga (C+), kiekvienos:	4,0 µl
Bendrasis tūris	25,0 µl

- Atliekant PGR, šiluminio ciklo prietaisas naudojamas pagal 6 lentelėje aprašytą programą. Naudokite šiluminio ciklo prietaisą esant 2 °C/sek. greičiui. PGR atliekama iš viso naudojant 35 ciklus.

6 lentelė. PGR ciklų programa

	Temperatūra	Laikas
Pradinis aktyvinimo veiksmas	95 °C	15 min.
3 veiksmų ciklai (35 ciklai)		
Denatūracija:	94 °C	30 sek.
Prisijungimas:	60 °C	30 sek.
Išplėtimas:	72 °C	60 sek.
Ciklų skaičius:	35	
Galutinis išplėtimas:	72 °C	10 min.
Aušinimas:	4 °C	∞

Rezultatų aiškinimas

Fragmentų analizė „Agilent 2100“ bioanalizatoriumi

Analizė atliekama „Agilent 2100“ bioanalizatoriumi („Agilent Technologies“) naudojant „DNA 1000 LabChip[®]“. Vykdykite „DNA 1000 LabChip“ vadove pateiktas instrukcijas ir žiūrėkite, kad į „LabChip“ nepatektų rutuliukų. Dėl gelyje esančių magnetinių rutuliukų gali būti gauti netinkami rezultatai.

1. Paleiskite bioanalizatoriaus programinę įrangą **2100 expert**. Dalyje „**Contexts**“ (kontekstai) pasirinkite „**Instrument**“ (instrumentas), tada spustelėkite mygtuką „**Assay**“ (tyrimas) šalia „**Assay Selection**“ (tyrimo pasirinkimas).
2. Pasirinkite „**Electrophoresis**“ > **DNA 1000 Series II.xsy** (elektroforezė > DNA 1000 Series II.xsy). Parenkite lustą ir pradėkite tyrimą.
3. Norėdami įvertinti rezultatus, nustatykite aptikimo slenkstį:

- 3a. Dalyje „Contexts“ pasirinkite „Data“ (duomenys), tada spustelėkite skirtuką „Assay Properties“ (tyrimo ypatybės). Dešinėje pusėje iš išplečiamojo meniu pasirinkite „Global“ (visuotinis) ir „Normal“ (įprastas).
- 3b. Pasirinkite „Sample Setpoints“ > „Integrator“ > „height threshold (FU)“ (mėginio nustatyti taškai > integratorius > aukščio slenkstis (FU) ir šią reikšmę nustatykite kaip **0** (numatytoji reikšmė yra **20**), kad būtų aptikti visi signalai.

„AdnaTest ProstateDetect“ analizės rezultatai

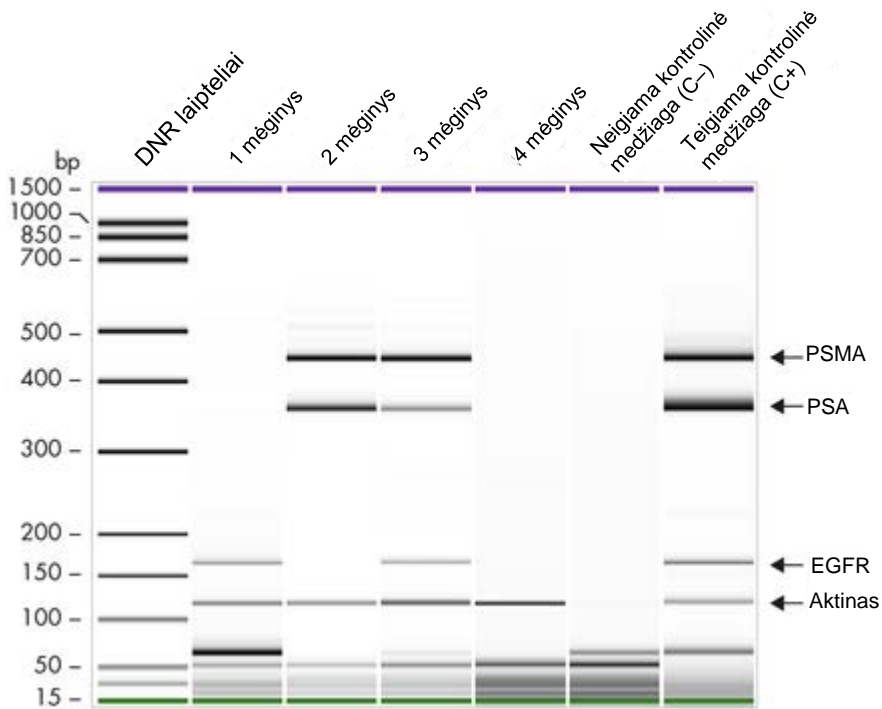
Tyrimas laikomas teigiamu, jei aiškiai aptinkamas bent vienas su vėžiu susijusio transkripto (PSMA, PSA arba EGFR) PGR fragmentas.

Naudojant „Agilent 2100“ bioanalizatorių, viršūnės esant $\geq 0,10$ ng/ μ l koncentracijai yra teigiamos. (3 pav).

Kontrolinio geno aktino fragmentas turi būti aptiktas visuose paciento mėginiuose (vidinė PGR kontrolinė medžiaga). Aktino signalas pateikia teigiamą kontrolinę medžiagą, kad būtų sėkmingai atliktas ląstelių atskyrimas, atvirkštinė transkripcija ir sudėtinė PGR. Neturi matytis neigiamos kontrolinės medžiagos ir RT kontrolinių mėginių fragmentų, didesnių nei 80 bazių porų (pradmenų dimerų).

Didesnis nei 900 bp fragmentas rodo užteršimą genomine DNR. Atskyrimo procesas buvo nesėkmingas ir šiuo atveju rezultatai yra netinkami.

SVARBU: jei nebus tiksliai laikomasi protokolo, gali būti gauti klaidingai neigiami ir klaidingai teigiami rezultatai.



3 pav. Naudojant „Agilent 2100“ bioanalizatorių išanalizuotų sudėtinės PGR mėginių „AdnaTest ProstateCancerDetect“ rezultatai. Pirmoje juostelėje parodytas DNR dydžio standartas (DNA laipteliai). 1 mėginys yra EGFR teigiamas, 2 mėginys – PSMA ir PSA teigiamas, o 3 mėginys – PSMA, PSA ir EGFR teigiamas. 4 mėginys yra neigiamas. Aktinas aptiktas 1–4 mėginiuose. PGR neigiamą (C-) ir teigiamą kontrolinę medžiagą (C+) parodyta paskutinėse dviejose juostelėse.

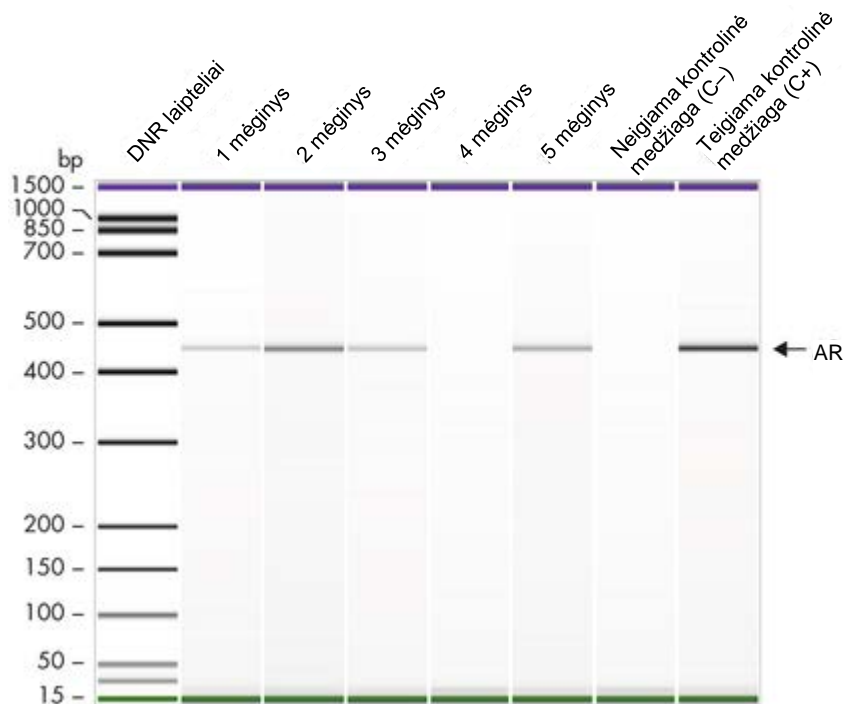
„AdnaTest AR-Detect“ analizės rezultatai

Naudojant „Agilent 2100“ bioanalizatorių, viršūnės esant $\geq 0,15$ ng/ μ l koncentracijai yra AR teigiamos. (4 pav).

Kontrolinio geno aktino fragmentas turi būti aptiktas visuose paciento mėginiuose (vidinė PGR kontrolinė medžiaga). Aktino signalas pateikia teigiamą kontrolinę medžiagą, kad būtų sėkmingai atliktas ląstelių atskyrimas, atvirkštinė transkripcija ir pavienė PGR. Neturi

matytis neigiamos kontrolinės medžiagos ir RT kontrolinių mėginių fragmentų, didesnių nei 80 bazių porų (pradmenų dimerų).

SVARBU: jei nebus tiksliai laikomasi protokolo, gali būti gauti klaidingai neigiami ir klaidingai teigiami rezultatai.



4 pav. Paviėnės PGR mėginių „AdnaTest ProstateCancerDetect“ rezultatai. Pirmoje juostelėje parodytas DNR dydžio standartas (DNA laipteliai). 1–3 mėginiai ir 5 mėginys yra AR teigiami. 4 mėginys yra neigiamas. PGR neigiama (C–) ir teigiama kontrolinė medžiaga (C+) parodyta paskutinėse dviejose juostelėse.

Trikčių šalinimo vadovas

Šis trikčių šalinimo vadovas gali padėti šalinant atsiradusias triktis. Daugiau informacijos rasite mūsų techninės pagalbos centro svetainės puslapyje „Frequently Asked Questions“ (dažniausiai užduodami klausimai) adresu www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN techninėse tarnybose dirbantys mokslininkai visada mielai atsakys į visus jums kilčius klausimus apie šiame vadove ir (arba) protokoluose pateiktą informaciją, mėginius ir tyrimų technologijas (kontaktinę informaciją rasite apsilankę www.qiagen.com).

Kokybės kontrolė

Pagal QIAGEN ISO sertifikuotą kokybės vadybos sistemą kiekviena „AdnaTest ProstateCancerSelect“ ir „AdnaTest ProstateCancerDetect“ partija tikrinama pagal nustatytas specifikacijas, kad būtų užtikrinta nuosekli produktų kokybė.

Apribojimai

Visi reagentai gali būti naudojami tik „in vitro“ diagnostikai.

Produktą turi naudoti tik personalas, specialiai išmokytas atlikti „in vitro“ diagnostines procedūras.

Svarbu, kad prieš naudodamas sistemą operatorius nuodugniai perskaitytų naudojimo instrukcijas.

Kad būtų užtikrinti optimalūs PGR rezultatai, reikia griežtai laikytis naudojimo instrukcijų nurodymų.

Patikrinkite tinkamumo datas, išspausdintas ant dėžutės ir visų komponentų etikečių. Nenaudokite komponentų pasibaigus tinkamumo laikui.

Visus gautus diagnostinius rezultatus reikia interpretuoti kartu su kitais klinikiniais ar laboratoriniais nustatytais faktais.

Veikimo charakteristikos

Atkūrimas

Dvi išaugintos „LnCap“ prostatos vėžio ląstelės buvo pridėtos į sveikų donorų kraujo mėginius, norint nustatyti atkūrimo rodiklius, gautus naudojant „AdnaTest ProstateCancerSelect/Detect“ (7 lentelė).

7 lentelė. Vėžio ląstelių, pridėtų į sveikų donorų kraujo mėginius, „AdnaTest ProstateCancer“ atkūrimo rodikliai

	Teigiamų rezultatų skaičius	Bendras mėginių skaičius
Į 5 ml kraujo pridėtos dvi vėžio ląstelės	38 (95 %)	40

2 vėžio ląstelių, pridėtų į 5 ml sveikų donorų kraują, aptikimo atkūrimo rodiklis yra 95 %.

Specifiškumas

Naudojant „AdnaTest ProstateCancerSelect/Detect“ buvo išanalizuota 40 sveikų donorų norint nustatyti klaidingai neigiamų rezultatų rodiklį esant nurodytai kritinei reikšmei (0,10 ng/μl kiekvieno įtraukto geno, išskyrus aktino, fragmentų koncentracijai).

8 lentelė. Specifiškumo nustatymas

Kontrolės	Bendras mėginių skaičius	Klaidingai teigiamų rezultatų skaičius	Specifiškumas (%)
Sveiki donoriai	40	0 (0%)	100

„AdnaTest ProstateCancerSelect/Detect“ parodė 100 % specifiškumą (8 lentelė).

Rezultatų atkartojamumas

Į dvidešimt mėginių, gautų iš sveikų donorų, buvo pridėta po 10 „LnCap“ prostatos vėžio ląstelių. Kad būtų nustatytas atkartojamumas, du operatoriai išanalizavo kraujo mėginius naudodami „AdnaTest ProstateCancerSelect/Detect“. Vidinis tyrimo atkartojamumas ir atkartojamumas tarp tyrimų buvo 100 % (9 lentelė).

9 lentelė. „AdnaTest ProstateCancer Select/Detect“ atkartojamumas

Operatorius	Teigiamų „AdnaTest“ rezultatų / mėginių	Vidinis tyrimo atkartojamumas (%)	Atkartojamumas tarp tyrimų (%)
A	10/10	100	100
B	10/10	100	100

Tikslumas

Norint nustatyti tikslumą, cDNR alikvotinės dalys buvo sujungtos ir išanalizuotos naudojant „AdnaTest ProstateCancerDetect“. Du operatoriai išanalizavo 30 cDNR mėginių – buvo atlikti 3 nepriklausomi 10 mėginių matavimai. Vidinis tyrimo tikslumas ir tikslumas tarp tyrimų buvo 100 % (10 lentelė).

10 lentelė. „AdnaTest ProstateCancerDetect“ tikslumas

Operatorius	Teigiamų „AdnaTest“ rezultatų / mėginių	Vidinis tyrimo tikslumas (%)	Tikslumas tarp tyrimų (%)
A	30/30	100	100
B	30/30	100	100

Trukdančios medžiagos

Antikoagulantai

Imant ir transportuojant kraują būtina naudoti antikoagulantus. Tačiau pridėjus „AdnaTest“ imunomagnetinių rutuliukų dėl heparino ir citrato susidaro dariniai, dėl kurių gali būti

negauti tyrimo rezultatai arba gauti klaidingai teigiami rezultatai. Tačiau EDTA ir ACDA (citrato / dekstrozės / adenino tirpalas A) yra suderinami su „AdnaTest“ imunomagnetiniais rutuliukais.

Hemolizė

Hemolizė kraujo mėginiuose (plazmos dalis atrodo raudona) dažniausiai pasireiškia dėl netinkamų transportavimo arba laikymo sąlygų. Tokių mėginių rezultatas gali būti klaidingai neigiamas, todėl juos reikia išmesti.

Chemoterapijos, tikslinės terapijos vaistai ir antihormoniniai režimai

Chemoterapiniai vaistai (taksanai, cisplatina, oksaliplatina, 5-FU, antraciklinas, irinotekanas ir kt.) yra stiprūs citotoksinai ir pažeidžia arba greitai pražudo kraujo mėginyje esančias ląsteles. Dėl to, naudojant „AdnaTest“ imunomagnetinius rutuliukus, yra didelė tikimybė, kad bus gauti klaidingai neigiami rezultatai. Gavus šių medžiagų, žmogaus kūnui reikia maždaug 5–7 dienų, kad galėtų jas detoksikuoti (11 lentelė). Šiuo metu paimtų kraujo mėginių negalima naudoti su „AdnaTest“ imunomagnetiniais rutuliukais.

11 lentelė. Chemoterapinių vaistų pusamžis

Vaistas	Pusamžis	Literatūra
5- fluorouracilas	Iki 20 min.	www.drugs.com/pro/fluorouracil-injection.html
Docetakselis	Iki 11,1 val.	www.drugs.com/pro/docetaxel.html
Cisplatina	Iki 30 min.	www.drugs.com/pro/cisplatin.html
Karboplatina	Iki 5,9 val.	www.drugs.com/pro/carboplatin.html
Paklitakselis	Maždaug 25,4 val.	www.drugs.com/pro/paclitaxel.html

Tokių pačių atsargumo priemonių rekomenduojama laikytis esant tikslinės terapijos režimams, pvz., antikūnų („Herceptin[®]“, bevacizumabo, cetuksimabo ir kt.), tirozino kinazės blokatorių (olaparibo, „Iressa[®]“, „Erbix[®]“, lapatinibo ir kt.) ir antihormoninių vaistų (tamoksifeno, abiraterono, enzalutamido ir kt.), naudojamų kaip atskiras vaistas arba derinant su chemoterapija.

Atliekant klinikinius tyrimus, rodančius cirkuliuojančių auglio ląstelių (CTC), nustatytų ir charakterizuotų naudojant „AdnaTest“ imunomagnetinius rutuliukus, prognostinę reikšmę, nebuvo stebima jokių neigiamų trukdžių dėl chemoterapinių vaistų, tikslinės terapijos ar antihormoninių terapijų, jei buvo laikomasi reikalavimo po vaistų vartojimo palaukti bent 7 dienas. Be to, buvo stebimas neigiamas įprastų bendrai naudojamų vaistų (aspirino, ibuprofeno, aprepitanto, steroidų ir kt.) poveikis, nors jis mažai tikėtinas.

Trukdančios sąlygos

Kraujo krešuliai

Klinikinių tyrimų kontekste po inkubacijos, naudojant *AdnaTest* imunomagnetinius rutuliukus, pastebėjome kraujo krešulių – dažniausiai vėlyvos ligos stadijos pacientų kraujo mėginiuose. Dėl didesnio klampumo kraujo mėginius, kuriuose susidaro krešulių, sunku apdoroti atliekant *AdnaTest* darbų eigą ir juos sunku lašinti. Be to, juose yra nepriimtina daug užteršiančių leukocitų, dėl kurių gaunami klaidingai teigiami rezultatai. Tokius mėginius reikia išmesti.

Gerybinė organinė liga ir lėtinės uždegiminės būklės

Dėl gerybinės organinės ligos ir lėtinių uždegimų, pvz., artrito, gerybinės prostatos hiperplazijos (BPH), krono ligos ir kt., klaidingai teigiami „AdnaTest“ rezultatai nepateikiami.

Ūmi alergija

Esant ūmioms alerginėms būklėms, po CTC pagausinimo naudojant „AdnaTest“ imunomagnetinius rutuliukus padaugėja užteršiančių leukocitų. Todėl negalima visiškai atmesti klaidingai teigiamų rezultatų galimybės.

Klinikiniai tyrimai

Iš viso buvo stebėta 12 pacientų, sergančių metastazavusiu kastracijai atsparu prostatos vėžiu (CRPC), gydomų docetakseliu. Pirmas mėginys buvo išanalizuotas pradiniam taške, o 2 kiti mėginiai – atliekant paskesnius tyrimus.

AR aktyvinimo atžvilgiu buvo aiškiai parodyta, kad AR aktyvinimas ir deaktyvinimas labai koreliuoja su CTC eliminavimo dėl terapinės intervencijos rodikliu. Tačiau terapijos kurso metu CTC teigiamų rezultatų skaičiaus rodiklis sumažėjo nuo 70 % pradiniam taške iki ~35 % atliekant paskesnius tyrimus, o AR teigiamų rezultatų skaičius sumažėjo nuo 55 % iki ~11 %. Dėl terapijos gydymas docetakseliu labiau veikia AR teigiamus CTC subklonus nei AR neigiamas CTC. Šie rezultatai gerai koreliuoja su rezultatais, aprašytais Darshan et al. (2011), kai buvo stebimas taksano sukeltas AR branduolinio transportavimo ir signalizavimo blokavimas.

Šie rezultatai rodo specifinį ir jautrų CTC aptikimą prostatos vėžio klinikiniuose mėginiuose, taip pat galimybę įvertinti genetinius profilius, susijusius su terapiniais tikslais.

Literatūra

Darshan, M.S. et al. (2011) Taxane-Induced Blockade to Nuclear Accumulation of the Androgen Receptor Predicts Clinical Responses in Metastatic Prostate Cancer. *Cancer Res.* 2011 Sep 15; **71(18)**: 6019–6029. Published online 2011 Jul 28. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1417.

Santrumpos

AdnaMag-L	Magnetinių dalelių koncentratorius (didelis)
AdnaMag-S	Magnetinių dalelių koncentratorius (mažas)
AR	Androgenų receptorius

bp	Bazių poros
C+	Teigiama kontrolinė medžiaga
C-	Neigiamos kontrolinės medžiagos
cDNR	Komplementinė deoksiribonukleino rūgštis
DNR	Deoksiribonukleino rūgštis
dNTPs	Deoksinukleotidų trifosfatai
EGFR	Epidermio augimo faktoriaus receptoriai
kb	kilobazė
mRNR	Matricinė ribonukleino rūgštis
PGR	Polimerazės grandininė reakcija
PSA	Prostatai būdingas antigenas
PSMA	Prostatai būdingas membranos antigenas
RNazė	Ribonukleazė
aps./min.	Apsisukimų per minutę
RT	Atvirkštinė transkripcija

Simboliai



Sudėtyje yra pakankamas reagentų kiekis <N> testams atlikti



Tinka iki



Temperatūros apribojimai



Katalogo numeris



Žr. vadove pateiktą informaciją



Gamintojas



„In vitro“ diagnostinis medicinos prietaisas



Medžiagos numeris



Bendrasis komercinis prekės numeris

Užsakymo informacija

Produktas	Turinys	Kat. Nr.
AdnaTest ProstateCancerSelect	CTCs išskyrimui ir vėlesniam mRNR išskyrimui iš žmogaus viso kraujo, 12 paruošimų	395432
AdnaTest ProstateCancerDetect	RT-PCR rinkinys, skirtas su prostatos vėžiu susijusiai genų ekspresijai pagausintose auglio ląstelėse aptikti	396432
Susiję produktai		
AdnaTubes	12 mėginių mėgintuvėlių su EDTA. Naudokite tik su antikoaguliotu krauju, surinktu BD A-CDA kraujo surinkimo mėgintuvėliuose	399932
AdnaMag-L	8 mėgintuvėliams, 15 ml	399921
AdnaMag-S	8 mėgintuvėliams, 1,5 ml	399911
Sensiscript RT Kit (50)	Skirta 50 atvirkštinės transkripcijos reakcijų.* „Sensiscript“ atvirkštinė transkriptazė, 150 µl 10x buferinis tirpalas RT, 100 µl dNTP mišinys (5 mM kiekvieno dNTP), 1,1 ml vandens be RNazės	205211
HotStarTaq Master Mix Kit (250 U)	3 x 0,85 ml „HotStarTaq“ pagrindinio mišinio (yra 250 vienetų „HotStarTaq“ DNR polimerazės, PGR buferinis tirpalas su 3 mM MgCl ₂ ir 400 µM kiekvieno dNTP) ir 2 x 1,7 ml vandens be RNazės	203443

* „Sensiscript RT“ rinkinio (50), naudojant „AdnaTest ProstateCancerDetect“, užteks tik 25 mėginiams, nes kiekvienai reakcijai reikia dvigubo tūrio.

Norėdami gauti naujausios informacijos apie licencijavimą ir atsakomybės už produktus apribojimus, žr. atitinkamą QIAGEN rinkinio vadovą arba naudotojo vadovą. QIAGEN rinkinio vadovai arba naudotojo vadovai pateikti svetainėje www.qiagen.com arba galite jų paprašyti QIAGEN techninių tarnybų ar vietinio platintojo.

„AdnaTest ProstateCancerSelect“ ir „AdnaTest ProstateCancerDetect“ ribotoji licencinė sutartis

Šio produkto naudojimas reiškia pirkėjo ar naudotojo sutikimą su šiomis sąlygomis:

1. Produktą galima naudoti tik vadovaujantis protokolais, pateiktais su šiuo produktu, šiuo vadovu ir tik su komplekte esančiais komponentais. QIAGEN nesuteikia jokios intelektualinės nuosavybės licencijos naudoti ar įtraukti pridėtus šio komplekto komponentus su į šį rinkinį neįeinančiais komponentais, išskyrus aprašytus protokoluose, pateiktuose su šiuo produktu, šiame vadove ir papildomuose protokoluose, esančiuose www.qiagen.com. QIAGEN vartotojams pateikiami keli papildomi protokolai. Šiuos protokolus QIAGEN kruopščiai patikrino ir optimizavo. QIAGEN neteikia garantijų, kad šie protokolai nepažeidžia trečiųjų šalių teisių.
2. Išskyrus licencijose nurodytus atvejus, QIAGEN nesuteikia garantijos, kad šis komplektas ir (arba) jo naudojimas nepažeis trečiųjų šalių teisių.
3. Komplektui ir jo komponentams suteikta licencija naudoti vieną kartą; pakartotinai naudoti, atnaujinti ar perparduoti negalima.
4. QIAGEN aiškiai atsisako bet kokių kitų išreikštų ar numanomų licencijų, išskyrus aiškiai nurodytas licencijas.
5. Komplekto pirkėjas ir naudotojas sutinka nesimti ir neleisti niekam kitam imtis veiksmų, kurie galėtų paskatinti arba palengvinti čia nurodytus draudžiamus veiksmus. QIAGEN gali priversti vykdyti šios Ribotosios licencinės sutarties draudimus bet kuriame teisme ir atgauti visus tyrimo ir teismo išlaidas, įskaitant išlaidas advokatams, pateikusi ieškinį dėl šios Ribotosios licencinės sutarties vykdymo arba su šiuo komplektu ir (arba) jo komponentais susijusių teisių į savo intelektualinę nuosavybę.

Atnaujintas licencijos sąlygas žr. www.qiagen.com.

Prekių ženklai: „QIAGEN“[®], „Sample to Insight“[™], „HotStarTaq“[™], „Sensiscript“[™] („QIAGEN Group“); „Agilent“[™] („Agilent Technologies, Inc.“); ERBITUX[®] („ImClone LLC.“, visiškos nuosavybės „Eli Lilly and Company“ filialas); „Herceptin“[™] („Genentech, Inc.“); IRESSA[®] („AstraZeneca Group“); „LabChip“[™] („Caliper Life Sciences, Inc.“); „Sarstedt“[™], „S-Monovette“[™] („Sarstedt AG and Co.“); „Vacutainer“[™] („Becton Dickinson and Company“).

HB-2396-001 © 2017 QIAGEN. Visos teisės saugomos.

Šis puslapis specialiai paliktas tuščias

Šis puslapis specialiai paliktas tuščias

Šis puslapis specialiai paliktas tuščias

Užsakymas www.qiagen.com/shop | Techninė pagalba support.qiagen.com | Svetainė www.qiagen.com