

Mars 2017

Handbok för AdnaTest ProstateCancerSelect och ProstateCancerDetect



12 (katalognummer 395432)

12 (katalognummer 396432)

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



395432 (AdnaTest ProstateCancerSelect)
396432 (AdnaTest ProstateCancerDetect)



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND



1106692SV

Innehåll

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

Protokoll: Multiplex och Singleplex PCR.....	22
Tolkning av resultat.....	25
Fragmentanalys på Agilent 2100 Bioanalyser.....	25
Felsökningsguide.....	29
Kvalitetskontroll.....	29
Begränsningar.....	29
Prestandaegenskaper.....	30
Utbyte.....	30
Specificitet.....	30
Reproducerbarhet.....	31
Precision.....	31
Interfererande substanser.....	31
Interfererande tillstånd.....	33
Kliniska studier.....	34
Referens.....	34
Förkortningar.....	34
Symboler.....	36
Beställningsinformation.....	37

Avsedd användning

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

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

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

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

Sammanfattning och förklaring

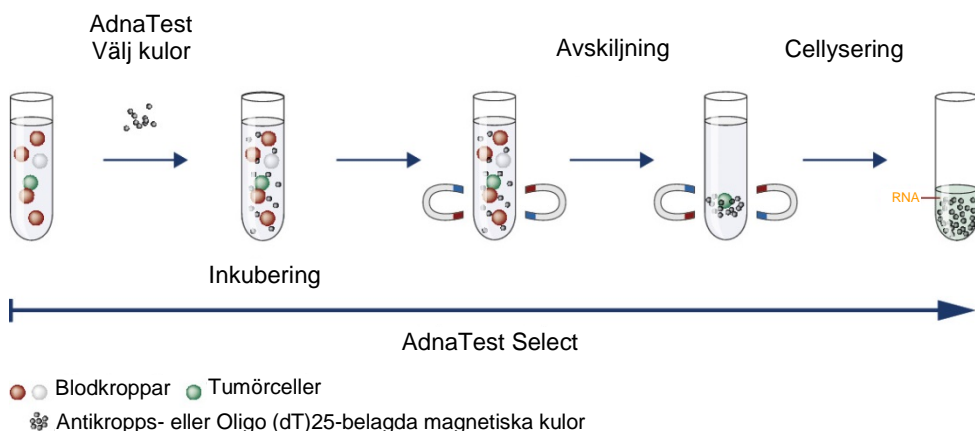
AdnaTest ProstateCancerSelect möjliggör immunomagnetisk anrikning av tumörceller via epiteliala och tumörassocierade antigener. AdnaTest ProstateCancerDetect används för analys av prostatacancer-associerat genuttryck i immunomagnetiskt anrikade tumörceller genom omvänd transkription och PCR.

Princip för proceduren

AdnaTest ProstateCancerSelect

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

Celllysaten används för vidare analys med AdnaTest ProstateCancerDetect.

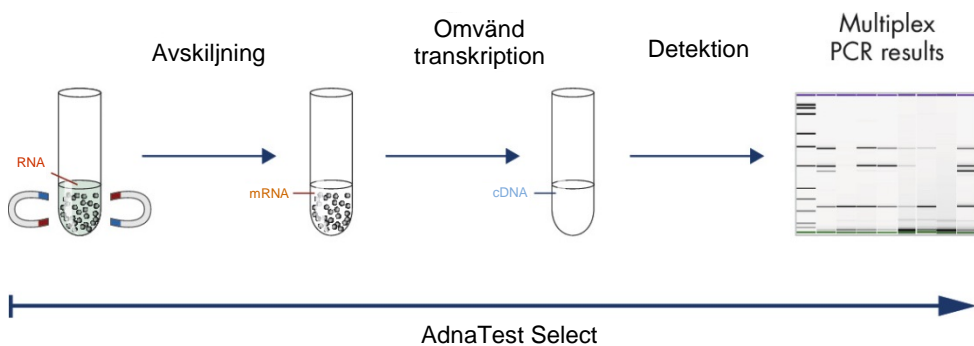


Figur 1. AdnaTest ProstateCancerSelect: Immunomagnetiskt cellval med flera tumörassocierade antikroppar. I det första steget så anrikas CTC:erna i blodet (AdnaTest Select). Det uppnås med hjälp av magnetiska partiklar (kulor) belagda med antikroppar. Flera antikroppar används, vilka binder med hög specificitet och affinitet för motsvarande cancerceller. De anrikade cellerna lyseras och renas flera gånger för att extrahera mRNA.

AdnaTest ProstateCancerDetect

AdnaTest ProstateCancerDetect innehåller Oligo (dT)₂₅-kulor för isolering av mRNA från lysatet av föranrikade tumörceller. Omvänd transkription resulterar i cDNA, vilket sedan

används som mall för detektion och karakterisering av tumörceller genom multiplex-PCR. AdnaTest PrimerMix ProstateDetect tillåter amplifiering av tre tumörassocierade antigener och en kontrollgen. AdnaTest PrimerMix AR-Detect tillåter amplifiering av androgenreceptor (AR).



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

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

De två AdnaTest-primermixarna genererar följande fragment:

PrimerMix ProstateDetect

- PSMA: 449 bp
- PSA: 357 bp
- EGFR: 163 bp
- Aktin: 120 bp (intern PCR-kontroll)

PrimerMix AR-Detect

- AR: 440 bp

Obs: Fragmentstorlekarna kan variera något. Var noga med att använda de positiva kontrollerna för AdnaTest för tilldelning av de detekterade signalerna.

Material som medföljer

Kitinnehåll

AdnaTest ProstateCancerSelect			
Antal tester			12
Katalognummer			395432
Insamlingsrör	Collection Tubes (Insamlingsrör) (15 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	3 x 5
Insamlingsrör	Collection Tubes (Insamlingsrör) (1,5 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	24
Röd	ProstateSelect Beads (kolor)	PSB	1,2 ml
Röd	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (lyserings-/bindningsbuffert)	LBB	2 x 1,2 ml
	Handbok		1

AdnaTest ProstateCancerDetect			
Katalognr.	396432		
Antal tester	12		
AdnaTest RNA-reagenter			
Röd	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (lyserings-/bindningsbuffert)	LBB	2 ml
Orange	Oligo(dT)25 Beads (kulor)	OdT	280 µl
Vit	RNA Purification Buffer A (RNA-reningsbuffert A)	BA	4ml
Vit	RNA Purification Buffer B (RNA-reningsbuffert B)	BB	4ml
Lila	Tris-HCL Buffer (Tris-HCL-buffert)	TB	2 ml
AdnaTest ProstateCancerDetect			
			Ask 2
Blått	AdnaTest PrimerMix ProstateDetect	PMP	144 µl
Orange	AdnaTest Positive Control Prostate (C+)	CONTROL +	40 µl
Gul	AdnaTest PrimerMix AR-Detect	PMA	144 µl
Rosa	AdnaTest Positive Control AR (C+)	CONTROL +	40 µl
	Handbok		1

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

Material som behövs men inte medföljer

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

AdnaTest ProstateCancerSelect

Utrustning

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

Material

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

Reagenser

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

AdnaTest ProstateCancerDetect

Utrustning

- Tube rotator for 1.5 ml tubes (rörroterare för 1,5 ml rör) (t.ex. ELMI Ltd., kat.nr IMIX-03)
- Magnetic particle concentrator AdnaMag-S (koncentratorer för magnetiska partiklar AdnaMag-S) (kat.nr 399911)
- Värmeblock eller vattenbad (65°C)
- Termocykler med uppvärmt lock och en uppvärmningshastighet på 2°C/s
- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)

Material

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

Reagenser

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

Varningar och försiktighet

För in vitro-diagnostisk användning

Säkerhetsinformation

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

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

Användningsinformation

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

Patent

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

Förvaring och hantering av reagenser

Förvaring

AdnaTest ProstateCancer-systemet levereras i tre askar. AdnaTest ProstateCancerSelect (kat. nr. 395432) och AdnaTest RNA Reagensask 1 (Ask 1 med kat.nr. 396432) måste förvaras vid 2–8°C. Komponenterna får inte användas efter förfallodatumet.

AdnaTest ProstateCancerDetect Ask 2 (Ask 2 med kat.nr 396432), vilken innehåller AdnaTest PrimerMixes och AdnaTest positiva kontroller, måste lagras separat vid -30 till -15°C. För att förhindra möjlig kontaminering och upprepade temperaturförändringar, ska primermixen alikvoterats. Komponenterna får inte användas efter utgångsdatumet.

Hantering

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

Förvaring och hantering av prover

Provberedning

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

Protokoll: Anrikning av tumörceller med AdnaTest ProstateCancerSelect

Viktigt att tänka på före start

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

Åtgärder som ska utföras före start

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

Procedur A: Förberedelse av ProstateSelect-kulorna

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

Om mer än 10 prover ska bearbetas, använder du ytterligare 1,5 ml-reaktionsrör (medföljer inte).

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

Obs: Rör inte kulorna när du avlägsnar supernatanterna!

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

Procedur B: Välja tumörceller

1. Vid användning av standard-EDTA-rör, pipetterar du 5 ml av ett blodprov till ett 15 ml insamlingsrör.
Vid användning av ACD-A-blod i ett BD Vacutainer ACD-A-rör, överför du 5 ml blod till ett AdnaTube.
Obs: AdnaTubes är obligatoriska vid användning av BD Vacutainer ACD-A-rör.
2. Resuspendera ProstateSelect-kulorna noggrant (förberedda från steg 6 av procedur A) genom pipettering och tillsätt 100 µl av kulorna till varje blodprov.
3. Roterä rören långsamt (cirka 5 rpm) i 30 minuter vid rumstemperatur med en apparat som både kan luta och rotera.
4. Placera rören i AdnaMag-L utan magnetinsatsen. Vrid AdnaMag-L nedåt för att lossa bloddroppar som fastnat under locket.
5. Sätt in magnetinsatsen och inkubera rören i AdnaMag-L i 3 minuter vid rumstemperatur.
6. Avlägsna all blodsupernatant med hjälp av en 10 ml-pipett utan att röra kulorna.
Obs: Rör inte kulorna när du avlägsnar supernatanterna!
7. Tvättsteg:
 - 7a. Ta ut magnetinsatsen från AdnaMag-L.
 - 7b. Tillsätt 5 ml PBS Stäng rören och skaka försiktigt AdnaMag-L fram och tillbaka 5 gånger för att resuspendera de magnetiska kul/cell-komplexen.

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

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

Protokoll: Detektion av prostatacancer-associerat genuttryck i anrikade tumörceller med hjälp av AdnaTest ProstateCancerDetect

Viktigt att tänka på före start

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

Åtgärder som ska utföras före start

- Se till att AdnaTest lyserings-/bindningsbufferten ekvilibreras till rumstemperatur. Om du observerar fällningar, ekvilibrerar du bufferten till rumstemperatur och blandar den sedan tills de är helt upplösta.
- Ekvilibrera RNA-reningsbuffert A och RNA-reningsbuffert B till rumstemperatur. Lägg Tris-HCl-bufferten på is.
- Tina 10x RT-buffert och dNTP:er från Sensiscript RT-kitet i rumstemperatur. Blanda med vortexblandning. Centrifugera kort och lagra på is. Tina RNase-fritt vatten (ingår i Sensiscript RT-kitet).
- Värm upp ett värmeblock eller vattenbad till 65°C.

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

1. Resuspendera Oligo(dT)₂₅-kulorna noggrant före användning genom att pipettera; vortexa inte!
2. Beräkna den volym kulor som krävs för samtliga prover som ska bearbetas (20 µl per prov plus 10%) och överför den beräknade volymen till ett RNase-fritt 1,5 ml-reaktionsrör (medföljer inte).
3. Placera röret i AdnaMag-S.
Obs: Magnetinsatsen till AdnaMag-S kan sättas in i två positioner. Sätt alltid in magnetinsatsen så att den vita plastfilmen pekar framåt för att säkerställa att magneterna är bredvid reaktionsrören.
4. Avlägsna supernatanten med en pipett efter 1 minut.
5. Tvättsteg:
 - 5a. Ta ut magnetinsatsen från AdnaMag-S.
 - 5b. Tillsätt den ursprungliga volymen (steg 2, sida 18) AdnaTest lyserings-/bindningsbuffert och resuspendera kulorna genom upprepad pipettering. Resuspendera försiktigt för att undvika skumbildning.
 - 5c. Sätt in magnetinsatsen i AdnaMag-S.
 - 5d. Avlägsna all supernatant efter 1 minut.
 - 5e. Upprepa stegen 5a till 5d en gång (totalt två tvättar).
6. Ta bort röret från AdnaMag-S och resuspendera kulorna i AdnaTest lyserings-/bindningsbufferten till originalvolym (steg 2, sida 18). Fortsätt med "Procedur B: mRNA-isolering".

Procedur B: mRNA-isolering

1. Tillsätt 20 µl Oligo(dT)₂₅-kulor (steg 6, ovan) till varje rör med cellysat (steg 15, sida 16).
2. Rotera rören långsamt (cirka 5 rpm) i 10 minuter vid rumstemperatur med en apparat som både kan luta och rotera.
3. Placera rören i AdnaMag-S utan magnetinsats. Vrid AdnaMag-S nedåt för att lossa kulor och vätska som fastnat under locket.
4. Sätt in magnetinsatsen och avlägsna supernatanten efter 1 minut.
5. Tvättsteg 1:
 - 5a. Ta ut magnetinsatsen från AdnaMag-S.
 - 5b. Tillsätt 100 µl RNA-reningsbuffert A i varje rör och resuspendera kulorna genom upprepad pipettering. Skölj locket och rörväggarna noggrant för att undvika förlust av kulor.
 - 5c. Sätt in magnetinsatsen i AdnaMag-S.
 - 5d. Avlägsna all supernatant efter 1 minut.
 - 5e. Upprepa stegen 5a till 5d en gång (totalt två tvättar).
6. Tvättsteg 2:
 - 6a. Ta ut magnetinsatsen från AdnaMag-S.
 - 6b. Tillsätt 100 µl RNA-reningsbuffert B till varje rör. Resuspendera kulorna via pipettering och överför till nya 1,5 ml reaktionsrör (medföljer).
 - 6c. Sätt in magnetinsatsen i AdnaMag-S.
 - 6d. Avlägsna all supernatant efter 1 minut. Det här steget måste utföras noggrant (observera pelleten) eftersom kulorna kan glida och tas bort av misstag.
 - 6e. Upprepa stegen 6a till 6d en gång i samma reaktionsrör (totalt två tvättar).
7. Ta ut magnetinsatsen från AdnaMag-S.
8. Tillsätt 100 µl iskall Tris-HCl-buffert i varje rör och resuspendera kulorna genom att pipettera.

9. Sätt in magnetinsatsen i AdnaMag-S.
10. Avlägsna all supernatant efter 1 minut.
11. Ta ut magnetinsatsen från AdnaMag-S.
12. Resuspendera mRNA/kul-komplexet i 14,75 µl RNase-fritt vatten.
13. Överför rören till ett värmeblock eller ett vattenbad och inkubera i 5 minuter vid 65°C.
14. Placera rören på is omedelbart i minst 2 minuter.
15. Fortsätt omedelbart (inom 5 minuter) med omvänd transkription (Procedur C: Omvänd transkription med Sensiscript RT-kitet).
Spara inte mRNA/kul-komplexet!

Procedur C: Omvänd transkription med Sensiscript RT-kitet

1. Bered RT-huvudmixen på is. RT-huvudmixen bereds enligt beskrivningen i tabell 1 i en mängd som motsvarar antalet prover.
Volymen med RT-huvudmix ska vara 10% större än vad som är beräknat för det totala antalet reaktioner med omvänd transkription. En negativ kontroll-reaktion utan tillsats av mRNA måste alltid beredas (RT-kontroll).
2. Vortexblanda RT-huvudmixen. Centrifugera kort och pipettera 5,25 µl för varje reaktion i 0,2 ml-PCR-rör.
3. Resuspendera mRNA/kul-komplexen (steg 12, sida 20) noggrant med en pipett. Överför den totala volymen till 0,2 ml-PCR-reaktionsröret som innehåller RT-huvudmixen. Blanda noggrant genom att pipettera upprepade gånger.

Tabell 1. Konfiguration för den omvända transkriptionsreaktionen

Komponent	Volym
RT-huvudmix	
10x Buffer RT (10x RT-buffert)	2,0 µl
dNTP-mix (5 mM varje dNTP)	2,0 µl
RNase inhibitor (RNase-hämmare), 40 U/µl (Promega)	0,25 µl
Sensiscript Reverse Transcriptase (Sensiscript omvänt transkriptas)	1,0 µl
Mall-RNA* mRNA/bead complex or RNase free water (mRNA/kul-komplex eller RNase-fritt vatten)	14,75 µl
Total volym	20,0 µl

* Tillsätt 14,75 µl RNase-fritt vatten istället för mRNA/kul-komplexet som RT-kontroll. Volymen på mRNA/kul-komplexet kan variera något. Använd alltid den totala volymen för den omvända transkriptionen!

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

Tabell 2. Omvänt transkriptionsprogram

Temperatur	Tid
37°C	60 minuter
93°C	5 minuter
4°C	∞

5. Placera reaktionsrören med cDNA på is eller förvara vid max. -20 °C i max. 4 veckor. Fortsätt med "Protokoll: Multiplex och Singleplex PCR", sida 21.

Protokoll: Multiplex och Singleplex PCR

Viktigt moment före start

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

Åtgärder som ska utföras före start

- Tina HotStarTaq-huvudmixen (QIAGEN), AdnaTest PrimerMix ProstateDetect, AdnaTest Positive Control Prostate, AdnaTest PrimerMix AR-Detect, AdnaTest positiv kontroll AR och RNase-fritt vatten. Vortexblanda, centrifugera kort och lagra på is.

Procedur A: Multiplex PCR (AdnaTest ProstateDetect)

1. PCR-huvudmixen bereds enligt beskrivningen i tabell 3 efter antalet prover.
Volymberäkningen för PCR-huvudmixen ska inkludera minst 10% övertolym. Observera att en positiv kontroll prostata, RNase-fritt vatten som negativ kontroll och RT-kontrollen alltid måste ingå.
2. Fördela 21,0 µl PCR-huvudmix i 0,2 ml-PCR-reaktionsrör för varje beredning.
Resuspendera cDNA/kul-mixen genom att pipettera och tillsätt 4,0 µl av den i varje reaktionsrör.
Obs: Tillsätt 4,0 µl RNase-fritt vatten som negativ kontroll istället för cDNA.

Tabell 3. Förberedelse av Multiplex PCR

Komponent	Volym
Multiplex PCR-huvudmix	
HotStarTaq Master Mix (HotStarTaq-huvudmix)	12,5 µl
RNase-free water (RNase-fritt vatten)	4,5 µl
PrimerMix ProstateDetect	4,0 µl
cDNA eller RT-kontroll eller Negativ kontroll (RNase-fritt vatten) eller Positiv kontroll (C+) vardera:	4,0 µl
Total volym	25,0 µl

3. En termocykler används för PCR enligt programmet som beskrivs i tabell 4. Kör termocyklern med en ökning på 2°C/sekund. PCR utförs med totalt 42 cykler.

Tabell 4. PCR-cyklingsprogram

	Temperatur	Tid
Initialt aktiveringssteg	95°C	15 minuter
3-stegscyklning		
Denaturering:	94°C	30 sekunder
Hybridisering:	61°C	30 sekunder
Extension:	72°C	30 sekunder
Antal cykler:	42	
Slutlig extension:	72°C	10 minuter
Nedkyllning:	4°C	∞

Procedur B: Singleplex-PCR (AdnaTest AR-Detect)

1. PCR-huvudmixen bereds enligt beskrivningen i tabell 5 efter antalet prover.
Volymberäkningen för PCR-huvudmixen ska inkludera minst 10% övervolym. Observera att en AdnaTest positiv kontroll, RNase-fritt vatten som negativ kontroll och RT-kontrollen alltid måste ingå.
2. Fördela 21,0 µl PCR-huvudmix i 0,2 ml-PCR-reaktionsrör för varje beredning.
Resuspendera cDNA/kul-mixen genom att pipettera och tillsätt 4,0 µl av den i varje reaktionsrör.
Obs: Tillsätt 4,0 µl RNase-fritt vatten som negativ kontroll istället för cDNA.

Tabell 5. Förberedelse av singleplex PCR

Komponent	Volym
Singleplex PCR-huvudmix	
HotStarTaq Master Mix (HotStarTaq-huvudmix)	12,5 µl
RNase-free water (RNase-fritt vatten)	4,5 µl
PrimerMix AR-Detect	4,0 µl
cDNA eller RT-kontroll eller Negativ kontroll (RNase-fritt vatten) eller Positiv kontroll (C+) vardera:	4,0 µl
Total volym	25,0 µl

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

Tabell 6. PCR-cyklingsprogram

	Temperatur	Tid
Initialt aktiveringssteg	95°C	15 minuter
3-Stegscyklning (35 cykler)		
Denaturering:	94°C	30 sekunder
Hybridisering:	60°C	30 sekunder
Extension:	72°C	60 sekunder
Antal cykler:	35	
Slutlig extension:	72°C	10 minuter
Nedkylning:	4°C	∞

Tolkning av resultat

Fragmentanalys på Agilent 2100 Bioanalyser

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

1. Starta Bioanalyser-programvaran **2100 expert**. Välj **"Instrument"** under **"Contexts"** (**Kontexter**) och klicka sedan på **"Assay"** (**Analys**)-knappen bredvid **"Assay Selection"** (**Analysval**).
2. Välj **"Electrophoresis"** (**Elektrofores**) > **DNA 1000 Series II.xsy**. Förbered chipet och starta körningen.
3. Ställ in en detektionströskel för utvärdering av resultaten:
 - 3a. Välj **Data** under **"Contexts"** (**Kontexter**) och klicka sedan på fliken **"Assay Properties"** (**Analysegenskaper**). Från listmenyn till höger så väljer du **"Global"** och **"Normal"**.

- 3b. Välj **“Sample Setpoints” (Provinställningsvärden) > “Integrator” (Integrerare) > “height threshold (FU) (höjdröskelvärde (FU))** och ställ in det här värdet till **0** (standardvärdet är **20**) för att identifiera alla signaler.

Analys av resultaten för AdnaTest ProstateDetect

Testet anses vara positivt om ett PCR-fragment från minst ett tumörassocierat transkript (PSMA, PSA eller EGFR) kan detekteras tydligt.

Med hjälp av Agilent 2100 Bioanalyzer, är toppar med en koncentration på ≥ 0.10 ng/ μ l positiva (Figur 3).

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

Ett fragment som är större än 900 bp indikerar kontaminering med genomiskt DNA. I det här fallet lyckades inte separationsprocessen och resultaten är ogiltiga.

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

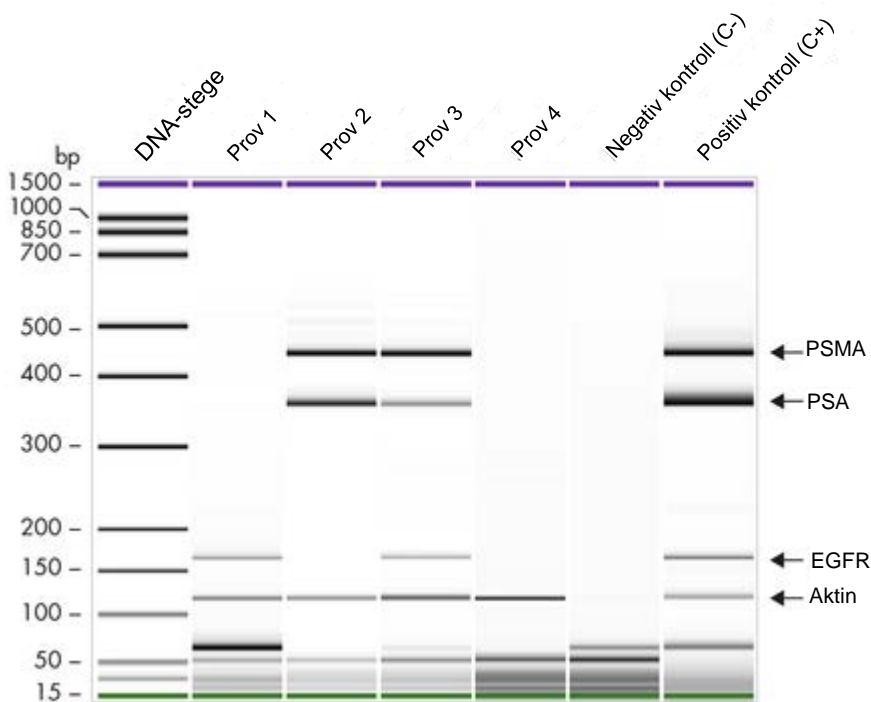


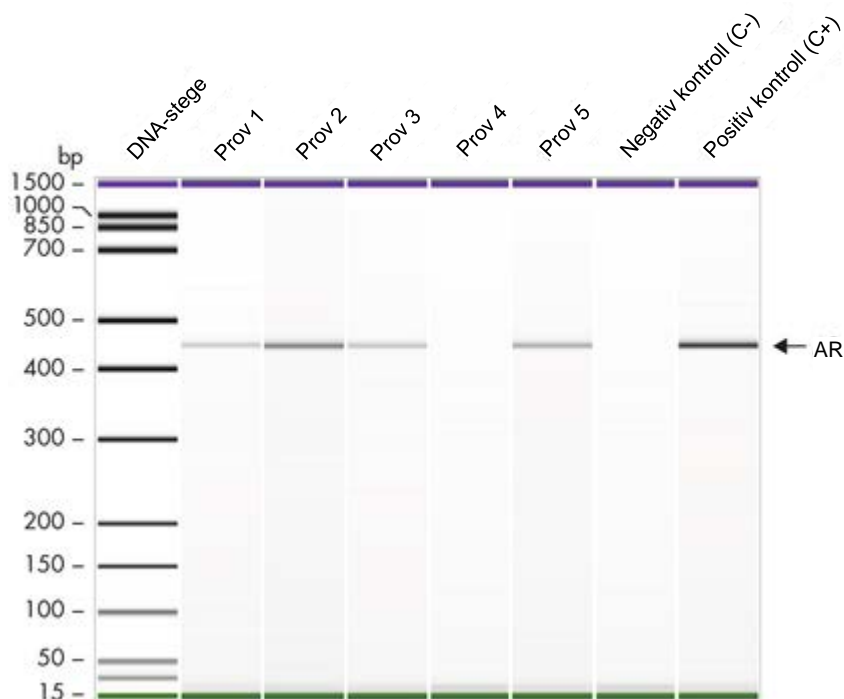
Bild 3. AdnaTest ProstateCancerDetect-resultat från multiplex PCR-prover som analyserats med Agilent 2100 Bioanalyser. I den första raden visas standarden för DNA-storlek (DNA-stege). Prov 1 är positivt för EGFR, prov 2 är positivt för PSMA och PSA och prov 3 är positivt för PSMA, PSA och EGFR. Prov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

Analys av resultaten för AdnaTest AR-Detect

Med hjälp av Agilent 2100 Bioanalyser, är toppar med en koncentration på $\geq 0,15$ ng/ μ l för AR positiva (Figur 4).

Fragmentet för kontrollgenens aktin måste detekteras i alla patientprover (intern PCR-kontroll). En aktinsignal fungerar som en positiv kontroll för en framgångsrik cellseparering, omvänd transkription och singleplex PCR. Den negativ kontrollen och RT-kontrollproverna får inte uppvisa band som är större än 80 baspar (primerer –dimerer).

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



Figur 4. AdnaTest ProstateCancerDetect-resultat för singleplex PCR-prover. I den första raden visas standarden för DNA-storlek (DNA-stege). Prov 1 till 3 och prov 5 är positiva för AR. Prov 4 är negativt. Den PCR-negativa (C-) och positiva kontrollen (C+) visas i de två sista raderna.

Felsökningsguide

Den här felsökningsguiden kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som kan uppstå. Mer information finns på sidan Frequently Asked Questions (Vanliga frågor) på vårt tekniska supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Dessutom svarar teamet för QIAGEN:s tekniska service gärna på frågor om informationen och/eller protokollen i denna handbok eller prov- och analysmetoder (för kontaktinformation, besök www.qiagen.com).

Kvalitetskontroll

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

Begränsningar

Alla reagenser får användas uteslutande i in vitro-diagnostik.

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

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

Bruksanvisningen måste följas strikt för optimala resultat för PCR.

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

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

Prestandaegenskaper

Utbyte

Två odlade LnCap-prostatacancer celler spikades i blodprover från friska personer för att fastställa utbytesgraderna som erhållits med AdnaTest ProstateCancerSelect/Detect (tabell 7).

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

	Antal positiva	Totalt antal prover
Två tumörceller spikade i 5 ml blod	38 (95%)	40

Utbytesgraden är 95 % för detektion av 2 tumörceller spikade i 5 ml blod från friska personer.

Specificitet

AdnaTest ProstateCancerSelect/Detect användes för att analysera 40 friska personer för att fastställa andelen falskt positiva resultat vid det givna cutoff-värdet (0,10 ng/μl fragmentkoncentration för varje testad gen, utom för aktin).

Tabell 8. Bestämning av specificitet

Kontroller	Totalt antal prover	Antal falska positiva	Specificitet (%)
Friska blodgivare	40	0 (0%)	100

AdnaTest ProstateCancerSelect/Detect visade en specificitet på 100 % (tabell 8).

Reproducerbarhet

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

Tabell 9. Reproducerbarhet för AdnaTest ProstateCancer Select/Detect

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

Precision

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

Tabell 10. Precision för AdnaTest ProstateCancerDetect

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

Interfererande substanser

Antikoagulanter

Antikoagulanter måste användas vid tagning och transport av blod. Heparin och citrat orsakar dock klumpbildning efter tillsats av immunomagnetiska AdnaTest-kulor, vilket kan

leda till att testresultat uteblir eller att testresultaten blir felaktiga. EDTA och ACDA (citrat/dextros/adeninlösning A) är dock kompatibla med de immunomagnetiska AdnaTest-kulorna.

Hemolys

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

Kemoterapeutika, målinriktade läkemedel och antihormonella behandlingar

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

Tabell 11. Halveringstid för kemoterapeutika

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

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

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

Interfererande tillstånd

Koagelbildning

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

Benign organisk sjukdom och kroniska inflammatoriska sjukdomar

Benign organisk sjukdom och kronisk inflammation, till exempel artrit, benign prostatahyperplasi (BPH), Crohns sjukdom etc. orsakar inte falskt positiva AdnaTest-resultat.

Akut allergi

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

Kliniska studier

Totalt 12 patienter med metastatisk kastrationsresistent prostatacancer (CRPC) följdes under behandling med docetaxel. Ett första prov analyserades vid baslinjen och 2 ytterligare prover analyserades under uppföljningen.

Med avseende på aktivering av AR visades det tydligt att AR-aktivering och -inaktivering korrelerade starkt med nivån på eliminering av CTC med hjälp av terapeutiska åtgärder. Positivitetsandelen för CTC sjönk dock under behandlingen från 70 % vid baslinjen till ~35 % under uppföljningen och AR-positiviteten minskade från 55 % till ~11 %. På grund av behandlingen påverkas AR-positiva CTC-subkloner mer av docetaxel-behandling än AR-negativa CTC. Dessa fynd korrelerar väl med de från Darshan et al. 2011 där en taxan-inducerad blockad av AR-nukleär transport och signalering observerades.

De här resultaten indikerar specifik och sensitiv detektion av CTC:er i kliniska prostatacancerprover samt en bedömning av genetiska profiler relaterade till terapeutiska mål.

Referens

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. Publicerat online den 28 juli 2011. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1417.

Förkortningar

AdnaMag-L	Koncentrator för magnetiska partiklar (-stora)
AdnaMag-S	Koncentrator för magnetiska partiklar (-små)
AR	Androgenreceptor

bp	Baspar
C+	Positiv kontroll
C-	Negativ kontroll
cDNA	Komplementär deoxiribonukleinsyra
DNA	Deoxiribonukleinsyra
dNTPs	Deoxinukleotidtrifosfater
EGFR	Epidermal tillväxtfaktorreceptor
kb	kilobaser
mRNA	Budbärrar-ribonukleinsyra
PCR	Polymeraskedjereaktion
PSA	Prostata-specifik antigen
PSMA	Prostata-specifik membranantigen
RNase	Ribonukleas
rpm	Varv per minut
RT	Omvänd transkription

Symboler



Innehåller tillräckligt med reagenser för <N> test



Används senast



Temperaturbegränsning



Katalognummer



Läs bruksanvisningen innan användning



Tillverkare



In vitro-diagnostisk medicinsk produkt



Materialnummer



GTIN-artikelnummer (Global Trade Item Number)

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
AdnaTest ProstateCancerSelect	För isolering av CTC:er och efterföljande extraktion av mRNA från humant helblod för 12 preparationer	395432
AdnaTest ProstateCancerDetect	RT-PCR-kit för detektion av prostatacancer-associerat gennytryck i anrikade tumörceller	396432
Relaterade produkter		
AdnaTubes	12 provrör innehållandes EDTA. Används enbart med antikoagulerat blod som samlats in med A-CDA-blodprovtagingsrör från BD	399932
AdnaMag-L	För 8 rör, 15 ml	399921
AdnaMag-S	För 8 rör, 1,5 ml	399911
Sensiscript RT Kit (50)	För 50 reaktioner med omvänd transkription: * Sensiscript omvänt transkriptas, 150 µl 10x buffert-RT, 100 µl dNTP-mix (innehåller 5 mM vardera dNTP), 1.1 ml RNase-fritt vatten	205211
HotStarTaq Master Mix Kit (250 U)	3 x 0,85 ml HotStarTaq-huvudmix (innehåller 250 enheter HotStarTaq DNA-polymeras, PCR-buffert med 3 mM MgCl ₂ och 400 µM av varje dNTP) och 2 x 1.7 ml RNase-fritt vatten	203443

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

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

Begränsat licensavtal för AdnaTest ProstateCancerSelect och AdnaTest ProstateCancerDetect

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

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

För uppdaterade licensavtal: se www.qiagen.com.

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

HB-2396-001 © 2017 QIAGEN, med ensamrätt.

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom.

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom.

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