

2017 m. kovas

AdnaTest OvarianCancerSelect ir OvarianCancerDetect vadovas



12 (katalogo numeris 395442)



12 (katalogo numeris 396442)

Skirtas auglio ląstelėms, gautoms iš kiaušidžių vėžiu sergančių pacientų kraujo, gausinti ir su kiaušidžių vėžiu susijusiai genų ekspresijai pagausintose auglio ląstelėse aptikti
Skirta „in vitro“ diagnostikai
1 versija

IVD

CE

REF

395442 („AdnaTest OvarianCancerSelect“)
396442 („AdnaTest OvarianCancerDetect“)



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, VOKIETIJA

R1 MAT

1106498LT

Sample to Insight



Turinys

Numatytoji paskirtis	4
Santrauka ir paaiškinimas	4
Procedūros principas.....	5
AdnaTest OvarianCancerSelect.....	5
AdnaTest OvarianCancerDetect	6
Pateikiamos medžiagos.....	7
Rinkinio turinys.....	7
Reikalingos, tačiau nepateikiamos medžiagos	9
AdnaTest OvarianCancerSelect.....	9
AdnaTest OvarianCancerDetect	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 OvarianCancerSelect“	14
Protokolas: su kiaušidžių vėžiu susijusios genų ekspresijos pagausintose auglio ląstelėse aptikimas naudojant „AdnaTest OvarianCancerDetect“	17

Protokolas: sudėtinė ir dviguba PGR.....	22
Rezultatų aiškinimas.....	26
Fragmentų analizė „Agilent 2100“ bioanalizatoriumi.....	26
Trikčių šalinimo vadovas.....	31
Kokybės kontrolė.....	31
Apribojimai.....	31
Veikimo charakteristikos.....	32
Atkūrimas.....	32
Specifiškumas.....	32
Rezultatų atkartojamumas.....	33
Tikslumas.....	33
Trukdančios medžiagos.....	34
Trukdančios sąlygos.....	36
Klinikiniai tyrimai.....	36
Santrumpos.....	37
Simboliai.....	38
Užsakymo informacija.....	39

Numatytoji paskirtis

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

„AdnaTest OvarianCancerDetect“ – 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 OvarianCancerSelect/Detect“ neskirtas naudoti atrankinės patikros tikslais ir neturi būti naudojamas kaip diagnostinis tyrimas norint patvirtinti kiaušidžių vėžį.

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

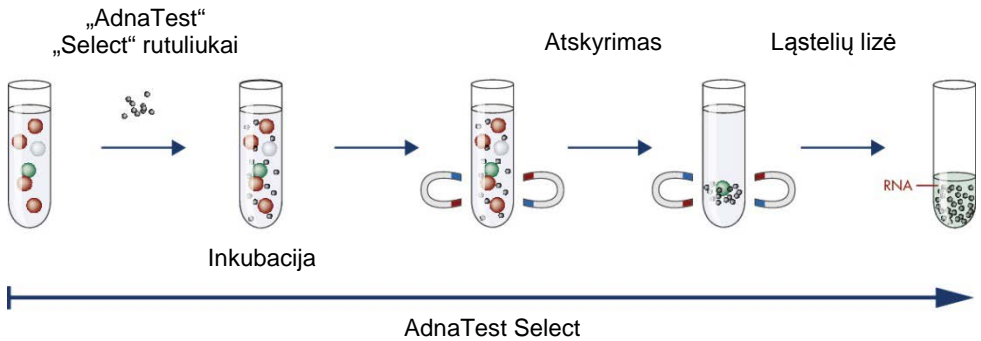
Santrauka ir paaiškinimas

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

Procedūros princīpas

AdnaTest OvarianCancerSelect

Epitelinu ir su augliu susijusiu antigenu antikūnai sujungiami su magnetiniais rutuliukais, kad visame kraujyje būtu pažymėtos auglio ląstelės. Pažymėtos ląstelės išskiriamos naudojant magnetinių dalelių koncentratorių (AdnaMag-L ir AdnaMag-S), tada lizuojamos (1 ir 2 pav.).



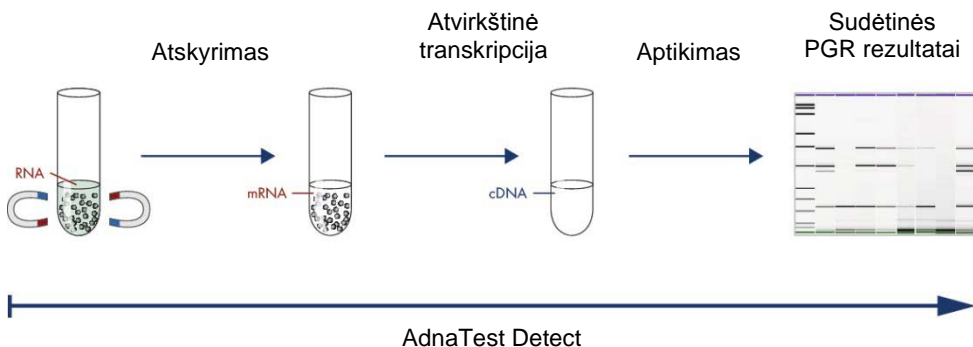
- ● Kraujo ląstelės ● Auglio ląstelės
- ⊗ Antikūnais arba „Oligo(dT)25“ padengti magnetiniai rutuliukai

1 pav. „AdnaTest OvarianCancerSelect“: imunomagnetinis ląstelių atrinkimas naudojant su augliu susijusius antikūnus.

Ląstelių lizatas naudojamas tolesnei analizei naudojant „AdnaTest OvarianCancerDetect“.

AdnaTest OvarianCancerDetect

„AdnaTest OvarianCancerDetect“ 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 / dvigubą PGR, matrica. Naudojant „PrimerMix OvarianDetect“ galima amplifikuoti tris su augliu susijusius antigenus ir vieną kontrolinį geną. „AdnaTest PrimerMix ERCC1-Detect“ amplifikuoja išpjovimo reparacijos kryžminės komplementacijos 1 geną (*ERCC1*) ir vieną kontrolinį geną.



● Kraujo ląstelės ● Auglio ląstelės

⊗ Antikūnais arba „Oligo(dT)₂₅“ padengti magnetiniai rutuliukai

2 pav. „AdnaTest OvarianCancerDetect“: 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 pradmenų mišiniai sukuria tokių dydžių fragmentus:

PrimerMix OvarianDetect

- CA125: 432 bp
- GA733-2: 395 bp

- Muc-1: 299 bp
- Aktinas: 120 bp (vidinė PGR kontrolinė medžiaga)

PrimerMix ERCC1-Detect

- ERCC1: 357 bp
- Aktinas: 120 bp (vidinė PGR kontrolinė medžiaga)

Pastaba: fragmentų dydžiai gali šiek tiek skirtis. Aptiktiems signalams priskirti naudokite „AdnaTest“ kiaušidžių teigiamą kontrolinę medžiagą ir „AdnaTest“ teigiamą kontrolinę medžiagą ERCC1.

Pateikiamos medžiagos

Rinkinio turinys

AdnaTest OvarianCancerSelect			
Katalogo numeris			395442
Tyrimų skaičius			12
Surinkimo mėgintuvėliai	„Collection Tubes“ (surinkimo mėgintuvėliai (15 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	3 × 5
Surinkimo mėgintuvėliai	„Collection Tubes“ (surinkimo mėgintuvėliai (1,5 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	24
Raudona	„OvarianSelect Beads“ („OvarianSelect“ rutuliukai)	OSB	1,2 ml
Raudona	„AdnaTest Lysis/Binding Buffer“ („AdnaTest“ lizės / susiejimo buferinis tirpalas)	LBB	2 × 1,2 ml
	Vadovas		1

AdnaTest OvarianCancerDetect			
Katalogo numeris	396442		
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 “ 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 OvarianCancerDetect	2 dėžutė		
Mėlyna	„AdnaTest PrimerMix OvarianDetect“ (pradmenų mišinys „AdnaTest PrimerMix OvarianDetect“)	PMO	144 µl
Oranžinė	„AdnaTest Positive Control Ovarian (C+)“ („AdnaTest“ kiaušidžių teigiama kontrolinė medžiaga (C+))	CONTROL +	56 µl
Mėlyna	„AdnaTest PrimerMix ERCC1-Detect“ (pradmenų mišinys „AdnaTest PrimerMix ERCC1-Detect“)	PME	144 µl
Oranžinė	„AdnaTest Positive Control ERCC1 (C+)“ („AdnaTest“ teigiama kontrolinė medžiaga ERCC1 (C+))	CONTROL +	56 µl
	Vadovas		1

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

Reikalingos, tačiau nepateikiamos medžiagos

Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinę pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose saugos duomenų lapuose (SDS), kuriuos gali pateikti produkto tiekėjas.

AdnaTest OvarianCancerSelect

Įranga

- „Tube rotator for 15 ml and 1.5 ml tubes“ (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 aeroliniais 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 OvarianCancerDetect

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 (50°C)
- Šiluminio ciklo prietaisas su šildomu dangteliu, šildymo greitis 2 °C/sek.
- „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, 2.500 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 chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite 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 OvarianCancerDetect“ testui reikalingos „Hoffmann-La Roche AG“, Bazelyje, licencijos. Įsigijus „AdnaTest OvarianCancerDetect“, naudotojui nesuteikiama teisė atlikti PGR be licencijos.

Reagentų laikymas ir naudojimas

Laikymas

„AdnaTest OvarianCancer“ sistema pateikiama trijose dėžutėse. „AdnaTest OvarianCancerSelect“ (kat. nr. 395442) ir „AdnaTest RNA Reagent Box 1“ („AdnaTest“ reagentų 1 dėžutė) (1 dėžutės kat. nr. 396442) turi būti laikomi 2–8 °C temperatūroje. Komponentų negalima naudoti pasibaigus tinkamumo laikui.

„AdnaTest OvarianCancerDetect Box 2“ („AdnaTest OvarianCancerDetect“ 2 dėžutė) (2 dėžutės kat. nr. 396442), 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

- „OvarianSelect“ rutuliukuose yra natrio azido kaip konservanto. Natrio azidas yra citotoksinis, todėl prieš naudojant rutuliukus jį reikia pašalinti. (Žr. „Protokolas: Auglio ląstelių pagausinimas naudojant „AdnaTest OvarianCancerSelect““, 14 psl.)
- Visi komponentai ir papildomi reagentai, pateikti kitų tiekėjų, turi būti laikomi pagal jų instrukcijas. Taikomi atitinkamų gamintojų saugos patarimai.
- Dėvėkite apsaugines pirštines, kad išvengtumėte užteršimo DNR, RNR ir RNazėmis.
- „OvarianSelect“ 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.
- Reikia laikytis laboratorijos saugos ir higienos reikalavimų (pvz., dėvėti laboratorinius chalatus, mūvėti pirštines ir užsidėti apsauginius akinius).

Bandinio naudojimas ir laikymas

Mėginio paruošimas

- Kraujo mėginiai turi būti paimti prieš naudojant terapines medžiagas. „AdnaTest OvarianCancerSelect“ 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“, kat. nr. 399932.
- Kraujas iš karto turi būti laikomas 4 °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 OvarianCancerSelect“

Svarbi informacija prieš pradėdant

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

Ką reikia atlikti prieš pradėdant

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

Procedūra A: „OvarianSelect“ rutuliukų paruošimas

1. Kruopščiai išmaišykite „OvarianSelect“ rutuliukus įsiurbdami ir lašindami pipete; nepurtykite!
2. Apskaičiuokite „OvarianSelect“ 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.
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). Pereikite prie „Procedūra B: auglio ląstelių pasirinkimas“, žemiau.

Procedūra B: auglio ląstelių pasirinkimas

1. Jei naudojate standartinius EDTA mėgintuvėlius, pipete įlašinkite 5 ml kraujo mėginio į 15 ml surinkimo mėgintuvėlį (pateikiamas).

Jei naudojate ACD-A kraują „BD Vacutainer ACD-A“ mėgintuvėlyje, perkelkite 5 ml kraujo į „AdnaTube“.

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

2. Įsiurbdami ir lašindami pipete kruopščiai išmaišykite „OvarianSelect“ 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 kiekvieną supernatantą (ląstelių lizatą) į naują 1,5 ml reakcijų mėgintuvėlį.
16. Išmeskite mėgintuvėlius su rutuliukais.
17. Iš karto tęskite atlikdami mRNR išskyrimą (žr. „Protokolas: su kiaušidžių vėžiu susijusios genų ekspresijos pagausintose auglio ląstelėse aptikimas naudojant „AdnaTest OvarianCancerDetect“[™], 17 psl.) arba ląstelių lizatus laikykite –20 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 2 savaites.

Protokolas: su kiaušidžių vėžiu susijusios genų ekspresijos pagausintose auglio ląstelėse aptikimas naudojant „AdnaTest OvarianCancerDetect“

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 reagentus iki kambario temperatūros ir išmaišykite, kol nuosėdos visiškai ištirs.
- 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 50°C.

Procedūra A: „Oligo (dT)₂₅“ rutuliukų paruošimas

1. Kruopščiai išmaišykite „Oligo(dT)₂₅“ rutuliukus įsiurbdami ir lašindami pipete. Nevartykite!

2. Apskaičiuokite rutuliukų tūrį, reikalingą visiems mėginiams apdoroti (20 µl vienam mėginiui pridėdant 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, 18 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, 18 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 (6 veiksmas, aukščiau).
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 29,5 µl vandens be RNazės.

13. Perkelkite mėgintuvėlius į šiluminį bloką arba vandens vonelę ir inkubuokite 5 minutes 50°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 kompleksu!

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 10,5 µl į 0,2 ml PGR mėgintuvėlius.

3. Atsargiai pipete išmaišykite mRNR / rutuliukų kompleksus (10 veiksmas, 19 ps.). 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	
10 x buferinis tirpalas RT	4,0 µl
dNTP mišinys (5 mM kiekvieno dNTP)	4,0 µl
RNazės inhibitorius, 40 U/µl („Promega“)	0,5 µl
„Sensiscript“ atvirkštinė transkriptazė	2,0 µl
RNR matrica*	29,5 µl
mRNR / rutuliukų kompleksas arba vanduo be RNazės	
Bendrasis tūris	40,0 µl

* Vietoj mRNR / rutuliukų komplekso įlašinkite 29,5 µl vandens be RNR-azės kaip RT kontrolinės medžiagos. mRNR / rutuliukų komplekso tūris gali šiek tiek skirtis. Atvirkštinės transkripcijos reakcijoje visada naudokite bendrąjį tūrį.

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

2 lentelė. Atvirkštinė transkripcijos programa

Veiksmas	Laikas	Temperatūra
Atvirkštinė transkripcija	60 min.	37°C
Denatūracija	5 min.	93°C
Vėsinimas	∞	4°C

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

Protokolas: sudėtinė ir dviguba PGR

Svarbi informacija prieš pradėdant

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

Ką reikia atlikti prieš pradėdant

- Atšildykite „HotStarTaq“ pagrindinį mišinį (QIAGEN), „AdnaTest PrimerMix OvarianDetect“, „AdnaTest PrimerMix ERCC1-Detect“, „AdnaTest“ kiaušidžių teigiamą kontrolinę medžiagą, „AdnaTest“ teigiamą kontrolinę medžiagą ERCC1 ir vandenį be RNazės. Papurtykite, greitai centrifuguokite ir laikykite ant ledo.

Procedūra A: sudėtinė PGR („AdnaTest OvarianDetect“)

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

PGR pagrindinio mišinio tūris turi būti 10 % didesnis, nei apskaičiuotas pagal mėginių skaičių. Atkreipkite dėmesį, kad visada turi būti įtraukta „AdnaTest“ kiaušidžių teigiama kontrolinė medžiaga, vanduo be RNazės kaip neigiama kontrolinė medžiaga ir RT kontrolinė medžiaga.

2. Ruošdami į 0,2 ml PGR reakcijų mėgintuvėlius įlašinkite 42,0 µl PGR pagrindinio mišinio. Įsiurbdami ir lašindami pipete išmaišykite cDNR / rutuliukų mišinį ir įlašinkite 8,0 µl šio mišinio į kiekvieną reakcijų mėgintuvėlį.

Pastaba: vietoj cDNR įlašinkite 8,0 µl vandens be RNazės kaip neigiamos kontrolinės medžiagos.

3 lentelė. Sudėtinės PGR paruošimas

Komponentas	Tūris
Sudėtinės PGR pagrindinis mišinys	
„HotStarTaq“ pagrindinis mišinys	25,0 µl
Vanduo be RNazės	13,0 µl
„AdnaTest PrimerMix OvarianDetect“ (pradmenų mišinys „AdnaTest PrimerMix OvarianDetect“)	4,0 µl
cDNR arba RT kontrolinė medžiaga, arba neigama kontrolinė medžiaga (vanduo be RNazės), arba „AdnaTest“ kiaušidžių teigiama kontrolinė medžiaga, kiekvienos:	8,0 µl
Bendrasis tūris	50,0 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 37 ciklus.

4 lentelė. PGR ciklų programa

Veiksmas	Laikas	Temperatūra
Pradinis aktyvinimo veiksmas	15 min.	95 °C
3 veiksmų ciklai		
Denatūracija	30 sek.	94°C
Prisijungimas	30 sek.	58°C
Išplėtimas	30 sek.	72°C
Galutinis išplėtimas:	10 min.	72°C
Vėsinimas	∞	12°C

Procedūra B: dviguba PGR („AdnaTest ERCC1-Detect“)

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

Pagrindinio mišinio tūris turi būti 10 % didesnis, nei apskaičiuotas pagal mėginių skaičių. Atkreipkite dėmesį, kad visada turi būti įtraukta „AdnaTest“ teigiama kontrolinė medžiaga ERCC1, vanduo be RNazės kaip neigiama kontrolinė medžiaga ir RT kontrolinė medžiaga.

2. Ruošdami į 0,2 ml PGR reakcijų mėgintuvėlius įlašinkite 42,0 µl pagrindinio mišinio. Įsiurbdami ir lašindami pipete išmaišykite cDNR / rutuliukų mišinį ir įlašinkite 8,0 µl šio mišinio į kiekvieną reakcijų mėgintuvėlį.

Pastaba: vietoj cDNR įlašinkite 8,0 µl vandens be RNazės kaip neigiamos kontrolinės medžiagos.

5 lentelė. Dvigubos PGR paruošimas

Komponentas	Tūris
Dvigubos PGR pagrindinis mišinys	
„HotStarTaq“ pagrindinis mišinys	25,0 µl
Vanduo be RNazės	13,0 µl
„AdnaTest PrimerMix ERCC1-Detect“ (pradmenų mišinys „AdnaTest PrimerMix ERCC1-Detect“)	4,0 µl
cDNR arba RT kontrolinė medžiaga, arba neigiama kontrolinė medžiaga (vanduo be RNazės), arba	8,0 µl
„AdnaTest“ teigiama kontrolinė medžiaga ERCC1, kiekvienos:	
Bendras tūris	50,0 µl

3. 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

Veiksmas	Laikas	Temperatūra
Pradinis aktyvinimo veiksmas	15 min.	95 °C
3 veiksmų ciklai		
Denatūracija	30 sek.	94°C
Prisijungimas	30 sek.	60°C
Išplėtimas	60 sek.	72°C
Galutinis išplėtimas:	10 min.	72°C
Vėsinimas	∞	12°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 klaidingi 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** (kontekstai) 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 OvarianDetect“ analizės rezultatai

Tyrimas laikomas teigiamu, jei aiškiai aptinkamas bent vienas su vėžiu susijusio transkripto (GA733-2, „Muc-1“ arba CA125) PGR fragmentas.

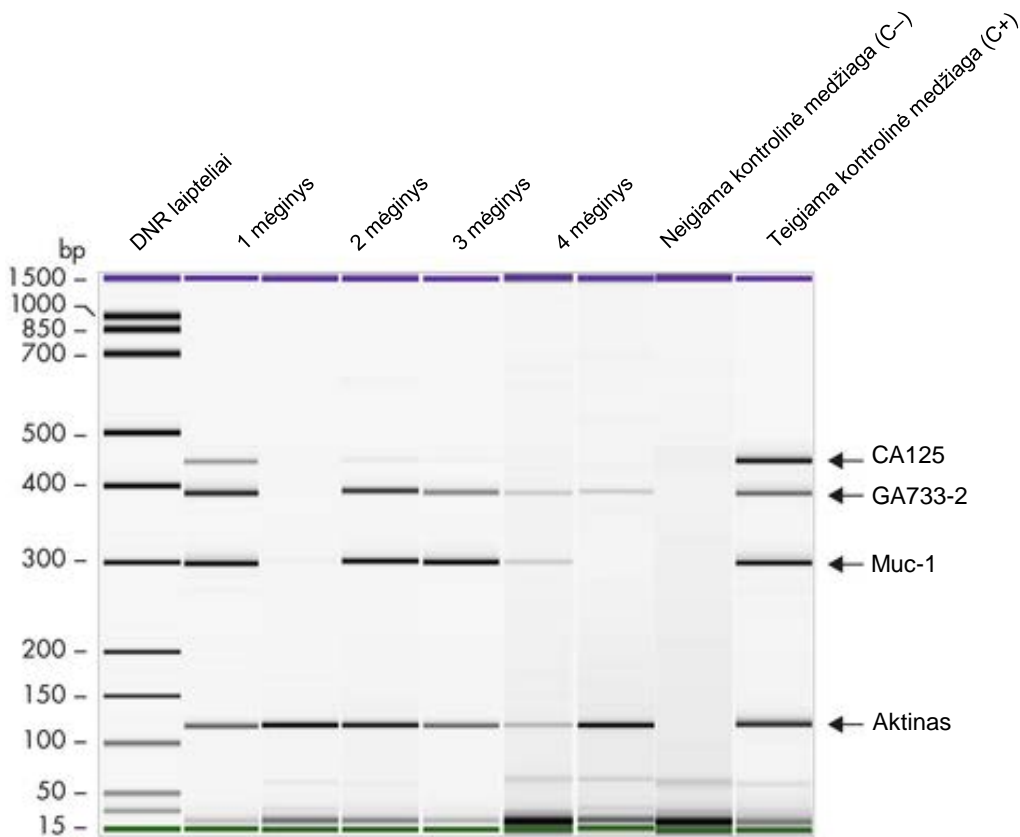
Naudojant „Agilent 2100“ bioanalizatorių, viršūnės esant $\geq 0,15$ ng/ μ l koncentracijai yra teigiamos. (3 pav).

Kontrolinio geno aktino fragmentas turi būti aptiktas visuose tyrimo 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 1000 bp fragmentas rodo užteršimą genomine DNR, o tai reiškia, kad problema kilo atskiriant ląsteles. Šiuo atveju rezultatai yra netinkami.

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

Jei reikia pagalbos aiškinant rezultatus nedvejodami kreipkitės į mūsų pagalbos komandą.



3 pav. Naudojant „Agilent 2100“ bioanalizatorių išanalizuotų sudėtinės PGR mėginių „AdnaTest OvarianCancerDetect“ rezultatai. Pirmoje juostelėje parodytas DNR dydžio standartas (DNA laipteliai). 1 mėginys yra GA733-2, „Muc-1“ ir CA 125 teigiamas, 3, 4 ir 5 mėginiai yra GA733-2 ir „Muc-1“ teigiami, o 6 mėginys yra GA733-2 teigiamas. 2 mėginys yra neigiamas. Aktinas aptiktas 1–6 mėginiuose. PGR neigiama ir teigiama kontrolinė medžiaga parodyta paskutinėse dviejose juostelėse.

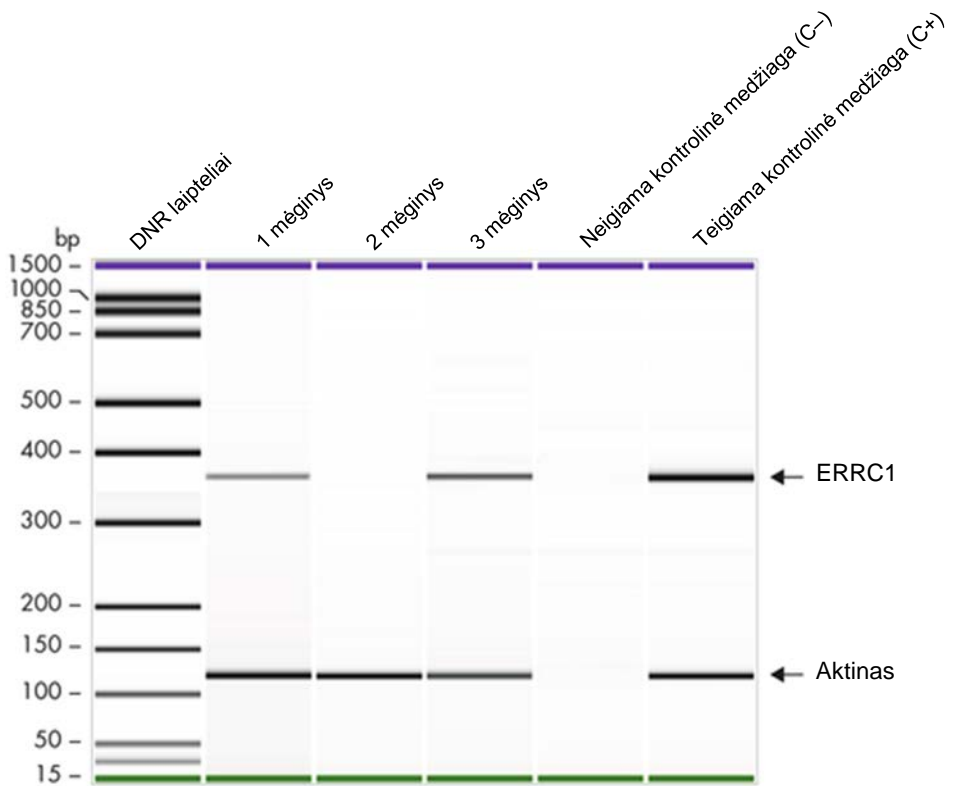
„AdnaTest ERCC1-Detect“ analizės rezultatai

Naudojant „Agilent 2100“ bioanalizatorių, viršūnės esant $\geq 0,2$ ng/ μ l koncentracijai yra ERCC1 teigiamos. (4 pav).

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

Jei reikia pagalbos aiškinant rezultatus nedvejodami kreipkitės į mūsų pagalbos komandą.



4 pav. Dvigubos PGR mėginių „AdnaTest OvarianCancerDetect“ rezultatai. Pirmoje juostelėje parodytas DNR dydžio standartas (DNA laipteliai). 1–3 mėginiai yra ERCC1 teigiami. 2 mėginys yra neigiamas. Aktinas aptiktas 1–3 mėginiuose. PGR neigiama ir teigiama kontrolinė medžiaga ERCC1 parodyta paskutinėse dviejose juostelėse.

Trikčių šalinimo vadovas

Žr. dažnai užduodamų klausimų puslapį mūsų techninės pagalbos centre: **www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx**. QIAGEN techninėse tarnybose dirbantys mokslininkai visada mielai atsakys į visus jums kilusius 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 OvarianCancerSelect“ ir „AdnaTest OvarianCancerDetect“ 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 ir 5 išaugintų „Igrov1“ kiaušidžių vėžio ląstelių buvo pridėtos į sveikų donorų kraujo mėginius, norint nustatyti atkūrimo rodiklius, gautus naudojant AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect (7 lentelė).

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

	Bendras mėginių skaičius	Teigiamų rezultatų skaičius	Atkūrimas
Į 5 ml kraujo pridėtos dvi vėžio ląstelės	20	18	90 %
Į 5 ml kraujo pridėta penkios vėžio ląstelės	20	20	100 %

2 vėžio ląstelių, pridėtų į 5 ml sveikų donorų kraują, aptikimo atkūrimo rodiklis yra 90 %.

5 vėžio ląstelių, pridėtų į 5 ml sveikų donorų kraują, aptikimo rodiklis yra 100 %.

Specifiškumas

Analizuojant 20 sveikų donorų buvo naudojamas „AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect“ norint nustatyti klaidingai neigiamų rezultatų rodiklį esant nurodytai kritinei reikšmei (0,15 ng/μl kiekvieno įtraukto geno, išskyrus aktino, fragmentų koncentracijai). „AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect“ parodė 95 % specifiškumą (8 lentelė).

8 lentelė. Specifikacijos nustatymas

Kontrolinės medžiagos	Bendras mėginių skaičius	Klaidingai teigiamų rezultatų skaičius	Specifiškumas (%)
Sveiki donorai	20	1 (5 %)	95

Rezultatų atkartojamumas

Į dvidešimt mėginių, gautų iš sveikų donorų, buvo pridėta po 10 „Igrov1“ kiaušidžių vėžio ląstelių. Kad būtų nustatytas atkartojamumas, du operatoriai išanalizavo kraujo mėginius naudodami „AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect“. Vidinis tyrimo atkartojamumas ir atkartojamumas tarp tyrimų buvo 100 % (9 lentelė).

9 lentelė. „AdnaTest OvarianCancer 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 OvarianCancerDetect“. 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 OvarianCancerDetect“ tikslumas

Operatorius	Teigiamų „AdnaTest“ rezultatų / mėginių	Vidinis tyrimo atkartojamumas (%)	Atkartojamumas 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 klininius 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 nepriimtinais daug užteršiančių leukocitų, dėl kurių gaunami klaidingai teigiami rezultatai. Tokius mėginius reikia išmesti.

Gerybinė organinė liga ir lėtinės uždegiminės būklės

Dėl gerybinė organinės ligos ir lėtinių uždegimų, pvz., artrito, 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

Klinikinio tyrimo naudojant „AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect“ rezultatai buvo paskelbti *Clinical Chemistry* 2014 m. spalio mėn. Šiame kiaušidžių vėžio tyrimo rinkinyje CTC gausinimui naudojami magnetiniai rutuliukai, pažymėti naudojant „anti-EpCAM“ ir „anti-MUC1“, tada atliekama *EpCAM*, *MUC1*, *CA125* ir *ERCC1* hiperekspresijos RT-PCR analizė. Šiame tyrime nustatant pirminę diagnozę buvo naudojami 147 pacienčių kraujo mėginiai. Pas 14 % pacienčių aptikta CTC ir reikšmingai prognozuotas bendras išgyvenamumas (OS; $p = 0,041$). Be to, pas 8 % pacienčių rasta ERCC1 teigiamų CTC, reikšmingai koreliuojančių su išgyvenamumu ligai neprogresuojant (DFS: $p = 0,009$) ir bendru išgyvenamumu (OS: $p = 0,026$). Svarbiausia, kad šis tyrimas aiškiai parodė, jog

ERCC1 teigiamos CTC nepriklausomai prognozuoja atsparumą platina pagrįstiems režimams ($p = 0,01$). Stebėtina, kad ši koreliacija rasta tik naudojant „AdnaTest“ molekulinį CTC charakterizavimą, bet nerasta naudojant IHC audinių dažymą pasitelkus antikūną 8F1, paprastai naudojamą ERCC1 aptikimui audiniuose.

Literatūra

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

Santrumpos

AdnaMag-L	Magnetinių dalelių koncentratorius (didelis)
AdnaMag-S	Magnetinių dalelių koncentratorius (mažas)
bp	Bazių poros
C+	Teigiama kontrolinė medžiaga
C–	Neigiamos kontrolinės medžiagos
CA125	Vėžio antigenas 125
cDNR	Komplementinė deoksiribonukleino rūgštis
DNR	Deoksiribonukleino rūgštis
dNTPs	Deoksiribonukleotidų trifosfatai
ERCC1	Išplovimo reparacijos kryžminė komplementacija 1
GA733-2	Skrandžio ir žarnų auglys, susijęs su antigenu 733-2
kb	kilobazė
mRNR	Matricinė ribonukleino rūgštis
Muc-1	„Muc-1“ genas
PGR	Polimerazės grandininė reakcija
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 OvarianCancerSelect	CTCs išskyrimui ir vėlesniam mRNR išskyrimui iš žmogaus viso kraujo, 12 paruošimų	395442
AdnaTest OvarianCancerDetect	RT-PCR rinkinys, skirtas su kiaušidžių vėžiu susijusiai genų ekspresijai pagausintose auglio ląstelėse aptikti	396442
Susiję produktai		
AdnaTube	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 OvarianCancerDetect“, 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 OvarianCancerSelect“ ir „AdnaTest OvarianCancerDetect“ 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 intelektinės 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 kompleksas 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 nesiminti 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 intelektinę 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-2344-001 © 2017 QIAGEN. Visos teisės saugomos.

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