

Mars 2017

Håndbok for AdnaTest OvarianCancerSelect og OvarianCancerDetect



12 (katalognummer 395442)



12 (katalognummer 396442)

For anriking av tumorceller fra fullblod hos pasienter med eggstokkreft og påvisning av eggstokkreft-assosiert genekspresjon i anrikede tumorceller
Til in vitro-diagnostisk bruk
Versjon 1



395442 (AdnaTest OvarianCancerSelect)
396442 (AdnaTest OvarianCancerDetect)



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
TYSKLAND



1106498NO

Sample to Insight



Innhold

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

Protokoll: Multiplex- og duplex-PCR	22
Tolkning av resultater	25
Fragmentanalyse på Agilent 2100 Bioanalyser	25
Feilsøkningsveiledning	29
Kvalitetskontroll	29
Begrensninger	29
Ytelseegenskaper	30
Gjenfinning	30
Spesifisitet	30
Reproduserbarhet	31
Presisjon.....	31
Interfererende substanser	32
Interfererende betingelser	33
Kliniske studier	34
Forkortelser	35
Symboler	36
Bestillingsinformasjon	37

Tiltenkt bruk

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

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

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

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

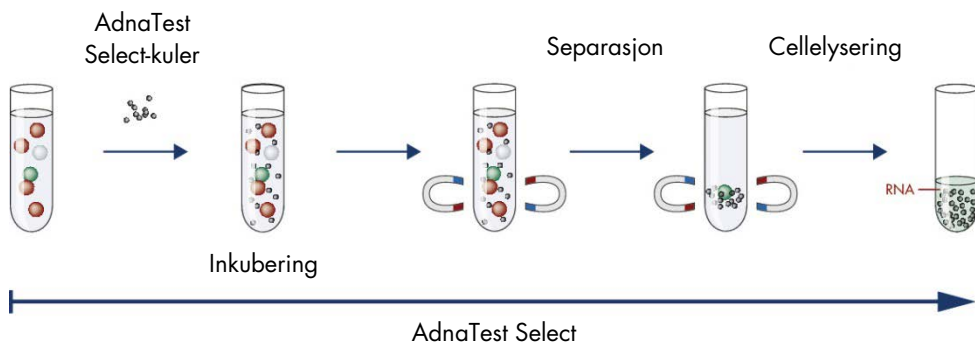
Sammendrag og forklaring

AdnaTest OvarianCancerSelect muliggjør immunmagnetisk anriking av tumorceller via epiteliale og tumorassosierte antigener. AdnaTest OvarianCancerDetect brukes til analyse av eggstokkreft-assosiert genekspresjon i immunmagnetisk anrikede tumorceller ved revers transkripsjon og PCR.

Prosedyreprinsipp

AdnaTest OvarianCancerSelect

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



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

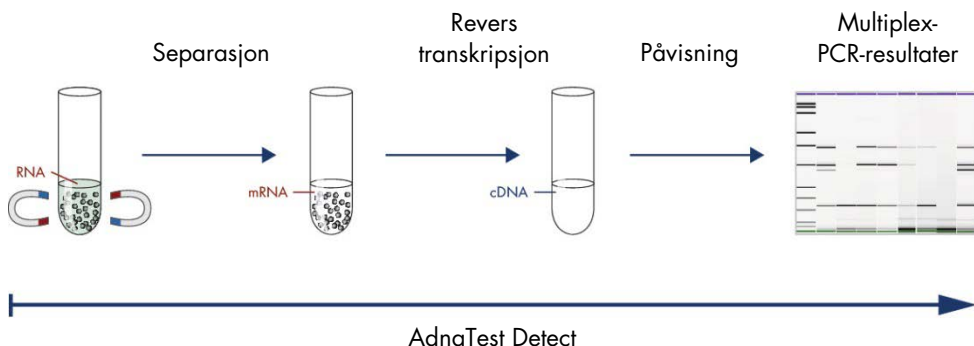
Figur 1. AdnaTest OvarianCancerSelect: Immunmagnetisk celleseleksjon med flere tumorassosierte antistoffer.

Cellelysatet blir brukt for videre analyse med AdnaTest OvarianCancerDetect.

AdnaTest OvarianCancerDetect

AdnaTest OvarianCancerDetect inneholder Oligo (dT)₂₅-kuler for isolering av mRNA fra lysatet av forhåndsanrikede tumorceller. Revers transkripsjon gir cDNA som deretter brukes som templat for påvisning av tumorceller og karakterisering av multiplex/duplex-PCR. AdnaTest PrimerMix OvarianDetect muliggjør amplifikasjon av tre tumorassosierte antigener

og ett kontrollgen. AdnaTest PrimerMix ERCC1-Detect amplifiserer *ERCC1*-genet (eksisjonsreparasjon, krysskomplementering 1) og ett kontrollgen.



● Blodceller ● Tumorceller

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

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

De to primerblandingene genererer fragmenter med følgende størrelser:

PrimerMix OvarianDetect

- CA125: 432 bp
- GA733-2: 395 bp
- Muc-1: 299 bp
- Aktin: 120 bp (intern PCR-kontroll)

PrimerMix ERCC1-Detect

- ERCC1: 357 bp
- Aktin: 120 bp (intern PCR-kontroll)

Merk: Fragmentstørrelser kan variere noe. Sørg for å bruke AdnaTest Positive Control Ovarian og AdnaTest Positive Control ERCC1 ved tilordning av de påviste signalene.

Materialer som følger med

Settets innhold

AdnaTest OvarianCancerSelect			
Katalognummer	395442		
Antall tester	12		
Collection Tubes	Collection Tubes (15 ml) (Prøverør (15 ml))	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	3 x 5
Collection Tubes	Collection Tubes (1.5 ml) (Prøverør (1,5 ml))	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	24
Rød	OvarianSelect Beads (OvarianSelect-kuler)	OSB	1,2 ml
Rød	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (AdnaTest lyserings-/ bindingsbuffer)	LBB	2 x 1,2 ml
	Håndbok (engelsk)		1

AdnaTest OvarianCancerDetect			
Katalognummer	396442		
Antall tester	12		
AdnaTest RNA Reagents (AdnaTest RNA-reagenser)			Eske 1
Rød	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (AdnaTest lyserings-/bindingsbuffer)	LBB	2 ml
Oransje	Oligo(dT) ₂₅ Beads (Oligo(dT) ₂₅ -kuler)	OdT	280 µl
Hvit	RNA Purification Buffer A (RNA-rensebuffer A)	BA	4 ml
Hvit	RNA Purification Buffer B (RNA-rensebuffer B)	BB	4 ml
Lilla	Tris-HCL Buffer (Tris-HCL-buffer)	TB	2 ml
AdnaTest OvarianCancerDetect			Eske 2
Blå	AdnaTest PrimerMix OvarianDetect	PMO	144 µl
Oransje	AdnaTest Positive Control Ovarian (C+) (Positiv AdnaTest-kontroll for eggstokk (C+))	CONTROL +	56 µl
Blå	AdnaTest PrimerMix ERCC1-Detect	PME	144 µl
Oransje	AdnaTest Positive Control ERCC1 (C+) (Positiv AdnaTest-kontroll for ERCC1 (C+))	CONTROL +	56 µl
	Håndbok (engelsk)		1

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

Materialer som er nødvendige, men som ikke følger med

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

AdnaTest OvarianCancerSelect

Utstyr

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

Materiale

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

Reagenser

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

AdnaTest OvarianCancerDetect

Utstyr

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

Materiale

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

Reagenser

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

Advarsler og forholdsregler

Til in vitro-diagnostisk bruk

Sikkerhetsinformasjon

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

Kast prøve- og analyseavfall i henhold til lokale sikkerhetsprosedyrer.

Informasjon om bruk

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

Patenter

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

Håndtering og oppbevaring av reagenser

Oppbevaring

AdnaTest OvarianCancer-systemet leveres i tre esker. AdnaTest OvarianCancerSelect (katalognr. 395442) og AdnaTest RNA Reagent Box 1 (eske 1 av katalognr. 396442) må oppbevares ved 2–8 °C. Komponentene må ikke brukes etter utløpt holdbarhetsdato.

AdnaTest OvarianCancerDetect Box 2 (eske 2 av katalognr. 396442), som inneholder AdnaTest PrimerMixes og AdnaTest Positive Controls, må oppbevares adskilt ved -30 til -15 °C. Primerblandingen skal alikvoteres slik at mulig kontaminering og gjentatte temperaturendringer forhindres. Komponentene må ikke brukes etter utløpt holdbarhetsdato.

Håndtering

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

Håndtering og oppbevaring av prøver

Prøveklargjøring

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

Protokoll: Anriking av tumorceller med AdnaTest OvarianCancerSelect

Viktige punkter før du starter

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

Ting du skal gjøre før du starter

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

Prosedyre A: Klargjøring av OvarianSelect-kuler

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

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

Prosedyre B: Seleksjon av tumorceller

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

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

Protokoll: Påvisning av eggstokkreft-assosiert genekspresjon i anrikede tumorceller med AdnaTest OvarianCancerDetect

Viktige punkter før du starter

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

Ting du skal gjøre før du starter

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

Prosedyre A: Klargjøring av Oligo(dT)₂₅-kuler

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

3. Sett røret inn i AdnaMag-S.

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

4. Fjern supernatanten med en pipette etter 1 minutt.

5. Vasketrinn:

5a. Fjern magnetskyveenheten fra AdnaMag-S.

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

5c. Sett magnetskyveenheten inn i AdnaMag-S.

5d. Fjern supernatanten helt etter 1 minutt.

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

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

Prosedyre B: mRNA-isolasjon

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

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

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

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

5. Vasketrinn 1:

- 5a. Fjern magnetskyveenheten fra AdnaMag-S.
- 5b. Tilsett 100 µl RNA-rensebuffer A i hvert rør, og resuspender kulene ved gjentatt pipettering. Skyll korken og rørvæggen grundig for å unngå tap av kuler.
- 5c. Sett magnetskyveenheten inn i AdnaMag-S.
- 5d. Fjern supernatanten helt etter 1 minutt.
- 5e. Gjenta trinn 5a til 5d én gang (to vaskinger totalt).

6. Vasketrinn 2:

- 6a. Fjern magnetskyveenheten fra AdnaMag-S.
- 6b. Tilsett 100 µl RNA-rensebuffer B i hvert rør. Resuspender kulene ved pipettering, og overfør dem til nye 1,5 ml reagensrør (følger med).
- 6c. Sett magnetskyveenheten inn i AdnaMag-S.
- 6d. Fjern supernatanten helt etter 1 minutt. Dette trinnet må utføres nøyte (følg med på pelleten) siden kulene kan gli og bli fjernet ved en feiltakelse.
- 6e. Gjenta trinn 6a til 6d én gang i de samme reagensrørene (to vaskinger totalt).

7. Fjern magnetskyveenheten fra AdnaMag-S.

8. Tilsett 100 µl iskald Tris-HCL-buffer i hvert rør, og resuspender kulene ved gjentatt pipettering.

9. Sett magnetskyveenheten inn i AdnaMag-S.

10. Fjern supernatanten helt etter 1 minutt.

11. Fjern magnetskyveenheten fra AdnaMag-S.

12. Resuspender mRNA/kule-kompleks i 29,5 µl RNase-fritt vann.

13. Overfør rørene til en termoblokk eller et vannbad, og inkuber i 5 minutter ved 50 °C.

14. Legg rørene på is umiddelbart i minst 2 minutter.

15. Fortsett umiddelbart (innen 5 minutter) med revers transkripsjon (Prosedyre (C): Revers transkripsjon med Sensiscript RT-settet).

mRNA/kule-komplekset skal ikke oppbevares!

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

1. Klargjør RT Master Mix på is. RT Master Mix klargjøres som vist i tabell 1 i henhold til antall prøver.
Volumet av RT Master Mix skal være 10 % større enn beregnet for det totale antallet reaksjoner med revers transkripsjon. En negativ kontrollreaksjon uten tilsetning av mRNA må alltid være klargjort (RT-kontroll).
2. Vorteks RT Master Mix. Sentrifuger et kort øyeblikk, og pipetter 10,5 µl for hver reaksjon i 0,2 ml PCR-rør.
3. Resuspender mRNA/kule-kompleksene (trinn 10, side 19) forsiktig med en pipette. Overfør det totale volumet til 0,2 ml PCR-reagensrør som inneholder RT Master Mix. Bland grundig ved gjentatt pipettering.

Tabell 1. Reaksjonsoppsett for revers transkripsjon

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

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

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

Tabell 2. Program for revers transkripsjon

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

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

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

Protokoll: Multiplex- og duplex-PCR

Viktig punkt før du starter

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

Ting du skal gjøre før du starter

- Tin HotStarTaq Master Mix (QIAGEN), AdnaTest PrimerMix OvarianDetect, AdnaTest PrimerMix ERCC1-Detect, AdnaTest Positive Control Ovarian, AdnaTest Positive Control ERCC1 og RNase-fritt vann. Vorteks, sentrifuger raskt, og oppbevar på is.

Prosedyre A: Multiplex-PCR (AdnaTest OvarianDetect)

1. PCR Master Mix klargjøres som vist i tabell 3 i henhold til antall prøver.

Volumet av PCR Master Mix skal være minst 10 % større enn det nødvendige volumet beregnet ut fra antall prøver. Vær oppmerksom på at AdnaTest Positive Control Ovarian, RNase-fritt vann som negativ kontroll og RT-kontrollen alltid må være inkludert.

2. For hvert preparat skal 42,0 µl PCR Master Mix pipetteres i 0,2 ml PCR-reagensrør. Resuspender cDNA/kule-blandingen ved pipettering, og tilsett 8,0 µl av den i hvert reagensrør.

Merk: Som negativ kontroll skal det tilsettes 8,0 µl RNase-fritt vann i stedet for cDNA.

Tabell 3. Klargjøring av multiplex-PCR

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

3. En termosyklus brukes til PCR i henhold til programmet som er beskrevet i tabell 4. Kjør termosykleren med en rampe på 2 °C/sekund. PCR blir utført med totalt 37 sykluser.

Tabell 4. PCR-syklusprogram

Trinn	Klokkeslett	Temperatur
Innledende aktiveringstrinn	15 minutter	95°C
3-trinns syklus		
Denaturering	30 sekunder	94 °C
Hybridisering	30 sekunder	58 °C
Forlengelse	30 sekunder	72 °C
Endelig forlengelse	10 minutter	72 °C
Kjøling	∞	12 °C

Prosedyre B: Duplex-PCR (AdnaTest ERCC1-Detect)

1. PCR Master Mix klargjøres som vist i tabell 5 i henhold til antall prøver.

Volumet av Master Mix skal være minst 10 % større enn det nødvendige volumet beregnet ut fra antall prøver. Vær oppmerksom på at AdnaTest Positive Control ERCC1, RNase-fritt vann som negativ kontroll og RT-kontrollen alltid må være inkludert.

2. For hvert preparat skal 42,0 µl Master Mix pipetteres i 0,2 ml PCR-reagensrør. Resuspender cDNA/kule-blandingen ved pipettering, og tilsett 8,0 µl av den i hvert reagensrør.

Merk: Som negativ kontroll skal det tilsettes 8,0 µl RNase-fritt vann i stedet for cDNA.

Tabell 5. Klargjøring av duplex-PCR

Komponent	Volum
Duplex PCR Master Mix	
HotStarTaq Master Mix	25,0 µl
RNase-fritt vann	13,0 µl
AdnaTest PrimerMix ERCC1-Detect	4,0 µl
cDNA eller RT-kontroll eller negativ kontroll (RNase-fritt vann) eller AdnaTest Positive Control ERCC1, hver:	8,0 µl
Totalt volum	50,0 µl

3. En termosyklus brukes til PCR i henhold til programmet som er beskrevet i tabell 6. Kjør termosyklern med en rampe på 2 °C/sekund. PCR blir utført med totalt 35 sykluser.

Tabell 6. PCR-syklusprogram

Trinn	Klokkeslett	Temperatur
Innledende aktiveringstrinn	15 minutter	95 °C
3-trinns syklus		
Denaturering	30 sekunder	94 °C
Hybridisering	30 sekunder	60 °C
Forlengelse	60 sekunder	72 °C
Endelig forlengelse	10 minutter	72 °C
Kjøling	∞	12 °C

Tolkning av resultater

Fragmentanalyse på Agilent 2100 Bioanalyser

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

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

Analyse av resultatene for AdnaTest OvarianDetect

Testen anses som positiv dersom et PCR-fragment av minst ett tumorassosiert transkript (GA733-2, Muc-1 eller CA125) tydelig påvises.

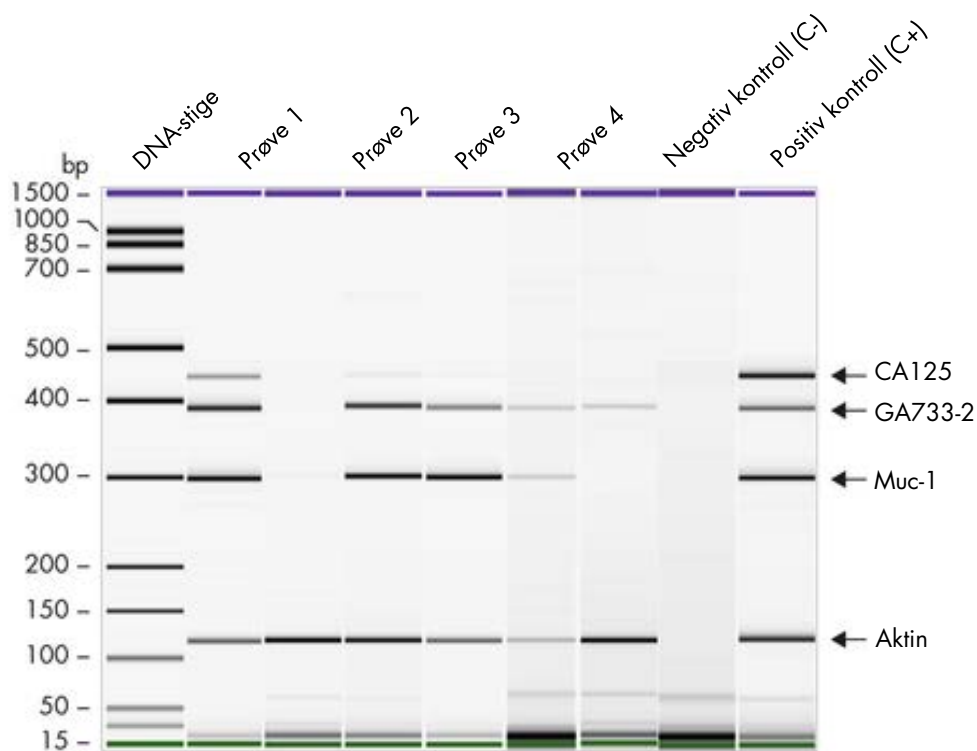
Hvis du bruker Agilent 2100 Bioanalyser, er topper med en konsentrasjon på $\geq 0,15$ ng/ μ l positive (figur 3).

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

Et fragment som er større enn 1000 bp, angir kontaminering med genomisk DNA, og tyder på at det har oppstått et problem under celleseparasjon. Resultatene er ugyldige i dette tilfellet.

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

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



Figur 3. AdnaTest OvarianCancerDetect-resultater fra multiplex-PCR-prøver analysert med en Agilent 2100 Bioanalyzer. Det første feltet viser DNA-størrelsesstandarden (DNA-stigen). Prøve 1 er positiv for GA733-2, Muc-1 og CA125, prøve 3, 4 og 5 er positive for GA733-2 og Muc-1, og prøve 6 er positiv for GA733-2. Prøve 2 er negativ. Aktin er påvist i prøve 1 til 6. PCR-negativ og -positiv kontroll vises i de siste to feltene.

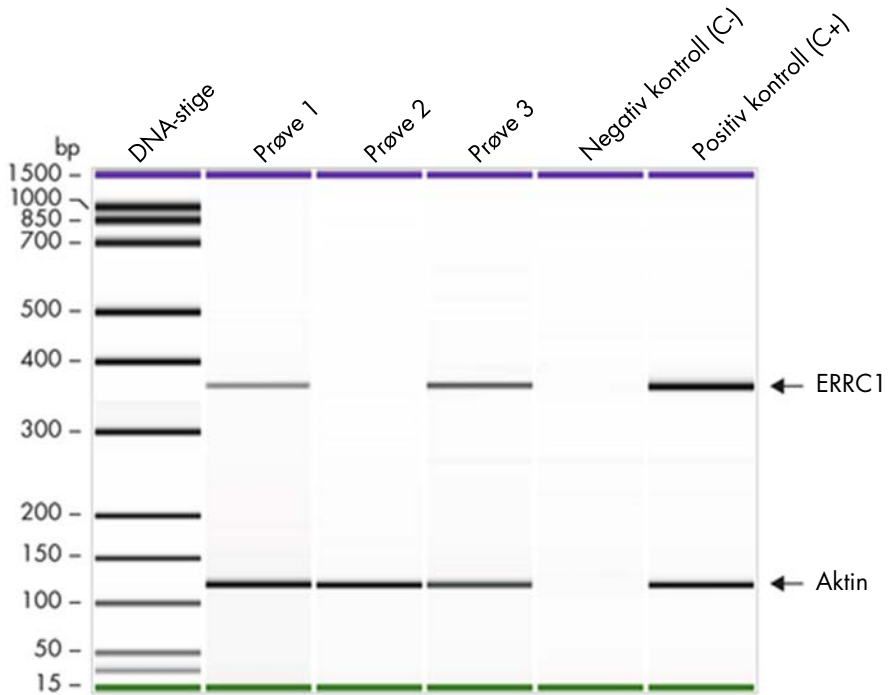
Analyse av resultatene for AdnaTest ERCC1-Detect

Hvis du bruker Agilent 2100 Bioanalyzer, er topper med en konsentrasjon på $\geq 0,2$ ng/ μ l for ERCC1 positive (figur 4).

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

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

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



Figur 4. AdnaTest OvarianCancerDetect-resultater fra duplex-PCR-prøver. Det første feltet viser DNA-størrelsesstandarden (DNA-stigen). Prøve 1 og 3 er positive for ERCC1. Prøve 2 er negativ. Aktin er påvist i prøve 1 til 3. PCR-negativ og -positiv kontroll (ERCC1) vises i de siste to feltene.

Feilsøkningsveiledning

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

Kvalitetskontroll

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

Begrensninger

Alle reagenser kan utelukkende brukes i in vitro-diagnostikk.

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

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

Strengt samsvar med bruksanvisningen kreves for optimale PCR-resultater.

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

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

Ytelsesegenskaper

Gjenfinning

To og 5 dyrkede Igrov1-eggstokkreftceller ble tilsatt i blodprøver fra friske donorer for å bestemme gjenfinningsrater som ble oppnådd med AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect (tabell 7).

Tabell 7. AdnaTest OvarianCancer-gjenfinningsrate for tumorceller tilsatt i blodprøver fra friske donorer

	Totalt antall prøver	Antall positive	Gjenfinning
To tumorceller tilsatt i 5 ml blod	20	18	90%
Fem tumorceller tilsatt i 5 ml blod	20	20	100 %

Gjenfinningsrate er 90% for påvisning av 2 tumorceller tilsatt i 5 ml blod fra friske donorer. Påvisning av 5 celler tilsatt i 5 ml blod fra friske donorer er 100 %.

Spesifisitet

AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect ble brukt til å analysere 20 friske donorer for å bestemme frekvens av falskt positive ved angitt cut-off (0,15 ng/µl fragmentkonsentrasjon for hvert gen som ble testet, unntatt aktin). AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect viste en spesifisitet på 95 % (tabell 8).

Tabell 8. Bestemmelse av spesifisitet

Kontroller	Totalt antall prøver	Antall falskt positive	Spesifisitet (%)
Friske donorer	20	1 (5%)	95

Reproduserbarhet

Tjue blodprøver fra friske donorer ble tilsatt 10 Igrov1-eggstokkreftceller per prøve. Blodprøver ble analysert av to operatører som brukte AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect for å bestemme reproduserbarheten. Intra-analyse- og inter-analyse-reproduserbarheten var 100 % (tabell 9).

Tabell 9. Reproduserbarhet for AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect

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

Presisjon

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

Tabell 10. Presisjon for AdnaTest OvarianCancerDetect

Operatør	Positive AdnaTest-resultater/-prøver	Intra-analyse-reproduserbarhet (%)	Inter-analyse-reproduserbarhet (%)
A	30/30	100	100
B	30/30	100	100

Interfererende substanser

Antikoagulanter

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

Hemolyse

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

Kjemoterapeutika, legemidler for målrettet behandling og antihormonelle behandlingsregimer

Kjemoterapeutika (taksaner, cisplatin, oksaliplatin, 5-FU, antracyklin, irinotekan, osv.) er potente cytotoksiner og forårsaker skade eller rask celledød i en blodprøve. Dette fører til en stor sannsynlighet for falskt negative resultater ved bruk av AdnaTest immunmagnetiske kuler. Når disse stoffene er administrert, trenger menneskekroppen rundt 5–7 dager til detoksifisering av stoffene (tabell 11). Blodprøver som tas i løpet av denne tiden, må ikke brukes med AdnaTest immunmagnetiske kuler.

Tabell 11. Halveringstid for kjemoterapeutika

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

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

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

Interfererende betingelser

Blodkoagulering

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

Benign organisk sykdom og kroniske betennelsestilstander

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

Akutt allergi

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

Kliniske studier

Resultatene fra en klinisk studie der AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect ble brukt, ble publisert i *Clinical Chemistry* i oktober 2014. Dette testsettet for eggstokkreft bruker magnetiske kuler merket med anti-EpCAM og anti-MUC1 for CTC-anrikelse, etterfulgt av påfølgende RT-PCR-analyse av *EpCAM*, *MUC1*, *CA125* og *ERCC1*-overekspressjon. I denne studien var blodprøver fra 147 pasienter tilgjengelig ved hoveddiagnose. CTC-er ble påvist hos 14 % av pasientene og viste en signifikant prediksjon av totaloverlevelse (OS: $p=0,041$). I tillegg viste ERCC1-positive CTC-er, som ble funnet hos 8 % av pasientene, signifikant korrelasjon med sykdomsfri overlevelse (DFS: $p=0,009$) og totaloverlevelse (OS: $p=0,026$). Det viktigste er at denne studien tydelig viste at ERCC1-positive CTC-er er en uavhengig prediktor for resistens mot platinabaserte regimer ($p=0,01$). Denne korrelasjonen ble overraskende nok bare funnet ved CTC-karakterisering av AdnaTest-molekylet, men ikke for IHC-vevsfarging ved hjelp av antistoffet 8F1 som vanligvis benyttes for ERCC1-påvisning i vev.

Referanse

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.

Forkortelser

AdnaMag-L	Konsentrator for magnetiske partikler (Large)
AdnaMag-S	Konsentrator for magnetiske partikler (Small)
bp	Basepar
C+	Positiv kontroll
C-	Negativ kontroll
CA125	Kreftantigen 125
cDNA	Komplementær deoksyribonukleinsyre
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dNTP-er	Deoksynukleotidtrifosfater
ERCC1	Eksisjonsreparasjon, krysskomplementering 1
GA733-2	Gastrointestinal tumorassosiert antigen 733-2
kb	kilobaser
mRNA	Budbringer-ribonukleinsyre
Muc-1	Muc-1-gen
PCR	Polymerasekjedereaksjon
RNase	Ribonuklease
o/min	Omdreininger per minutt
RT	Revers transkripsjon

Symboler



Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til <N> tester



Brukes innen



Temperaturbegrensning



Katalognummer



Se bruksanvisningen



Produsent



Medisinsk utstyr for in vitro-diagnostikk



Materialnummer



Globalt artikkelnummer

Bestillingsinformasjon

Produkt	Innhold	Katalognr
AdnaTest OvarianCancerSelect	For isolasjon av CTC-er og påfølgende ekstraksjon av mRNA fra humant fullblod for 12 klargjøringer	395442
AdnaTest OvarianCancerDetect	RT-PCR-sett for påvisning av eggstokkreft-assosiert genekspressjon i anrikede tumorceller	396442
Tilknyttede produkter		
AdnaTube	12 prøverør som inneholder EDTA. Skal kun brukes med antikoagulert blod som er tatt i A-CDA-blodprøverør fra BD	399932
AdnaMag-L	For 8 rør, 1,5 ml	399921
AdnaMag-S	For 8 rør, 1,5 ml	399911
Sensiscript RT Kit (50)	For 50 revers transkripsjon-reaksjoner: * Sensiscript revers transkriptase, 150 µl 10x buffer RT, 100 µl dNTP Mix (inneholder 5 mM hver dNTP), 1,1 ml RNase-fritt vann	205211
HotStarTaq Master Mix Kit (250 U)	3 x 0,85 ml HotStarTaq Master Mix (inneholder 250 enheter HotStarTaq DNA-polymerase, PCR-buffer med 3 mM MgCl ₂ og 400 µM av hver dNTP) og 2 x 1,7 ml RNase-fritt vann	203443

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

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

Begrenset lisensavtale for AdnaTest OvarianCancerSelect og AdnaTest OvarianCancerDetect

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

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

Oppdaterte lisensvilkår er tilgjengelige på www.qiagen.com.

Varemerker: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], HotStarTaq[®], Sensiscript[®] (QIAGEN Group); Agilent[®] (Agilent Technologies, Inc.); ERBITUX[®] (ImClone LLC., et heleid datterselskap av 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-2344-001 © 2017 QIAGEN. Med enerett.

Bestilling www.qiagen.com/shop | Teknisk støtte support.qiagen.com | Nettside www.qiagen.com