

2017 m. kovas

AdnaTest ColonCancerSelect ir ColonCancerDetect vadovas



12 (katalogo numeris 395422)



12 (katalogo numeris 396422)

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

Skirta „in vitro“ diagnostikai

1 versija



395422 („AdnaTest ColonCancerSelect“)

396422 („AdnaTest ColonCancerDetect“)



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, VOKIETIJA



1106497LT

Sample to Insight



Turinys

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

Protokolas: sudėtinė PGR	22
Rezultatų aiškinimas.....	24
Fragmentų analizė „Agilent 2100“ bioanalizatoriumi	24
Trikčių šalinimo vadovas	27
Kokybės kontrolė	27
Apribojimai.....	27
Veikimo charakteristikos.....	28
Atkūrimas	28
Specifiškumas	28
Rezultatų atkartojamumas.....	29
Tikslumas	29
Trukdančios medžiagos	30
Trukdančios sąlygos	31
Klinikiniai tyrimai.....	32
Literatūra	32
Santrumpos	33
Simboliai.....	33
Užsakymo informacija	34

Numatytoji paskirtis

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

„AdnaTest ColonCancerDetect“ – 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 ColonCancerSelect/Detect“ neskirtas naudoti atrankinės patikros tikslais ir neturi būti naudojamas kaip diagnostinis tyrimas norint patvirtinti storosios žarnos vėžį.

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

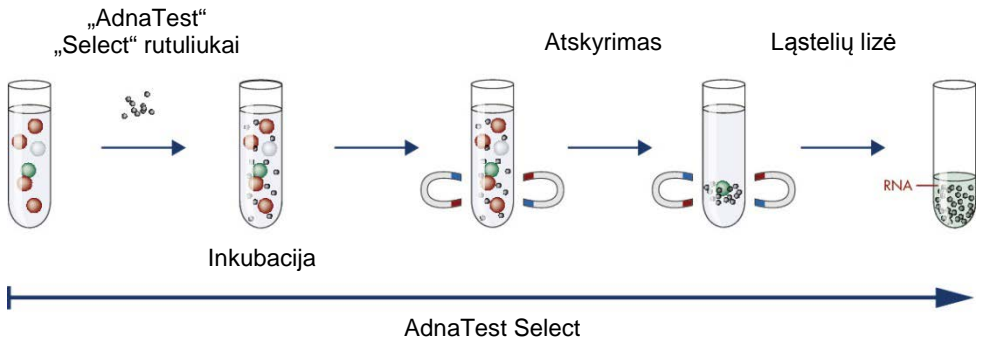
Santrauka ir paaiškinimas

Naudojant „AdnaTest ColonCancerSelect“ galima atlikti auglio ląstelių imunomagnetinį gausinimą pasitelkus epitelinius ir su augliu susijusius antigenus. „AdnaTest ColonCancerDetect“ naudojamas su storosios žarnos vėžiu susijusių genų ekspresijos imunomagnetiškai pagausintose vėžio ląstelėse analizei naudojant atvirkštinę transkripciją ir PGR.

Procedūros princīpas

AdnaTest ColonCancerSelect

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.).



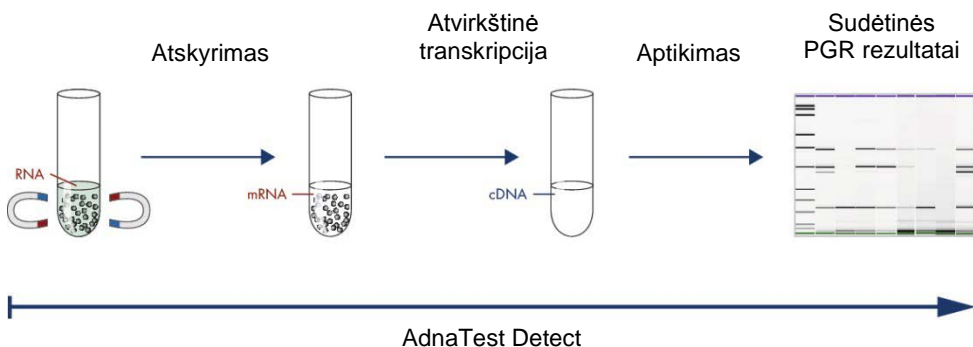
- ● Kraujo ląstelės ● Auglio ląstelės
- ⊞ Antikūnais arba „Oligo(dT)25“ padengti magnetiniai rutuliukai

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

Ląstelių lizatas naudojamas tolesnei analizei naudojant „AdnaTest ColonCancerDetect“.

AdnaTest ColonCancerDetect

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



● Kraujo ląstelės ● Auglio ląstelės

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

2 pav. „AdnaTest ColonCancerDetect“: 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.

Pradmenys sukuria tokių dydžių fragmentus:

- GA733-2: 395 bp
- CEA: 231 bp
- EGFR: 163 bp
- Aktinas: 120 bp (vidinė PGR kontrolinė medžiaga)

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

Pateikiamos medžiagos

Rinkinio turinys

AdnaTest ColonCancerSelect			
Katalogo numeris			395422
Tyrimų skaičius			12
Surinkimo mėgintuvėliai	„Collection Tubes“ (surinkimo mėgintuvėliai (1,5 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	3 × 5
Surinkimo mėgintuvėliai	„Collection Tubes“ (surinkimo mėgintuvėliai (15 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	24
Raudona	„ColonSelect Beads“ („ColonSelect“ rutuliukai)	CSB	1,2 ml
Raudona	„AdnaTest Lysis/Binding Buffer“ („AdnaTest“ lizės / susiejimo buferinis tirpalas)	LBB	2 × 1,2 ml
	Vadovas		1

AdnaTest ColonCancerDetect			
Katalogo numeris	396422		
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	4ml
Balta	„RNA Purification Buffer B“ (RNR gryninimo buferinis tirpalas B)	BB	4ml
Violetinė	„Tris-HCL Buffer“ („Tris-HCL“ buferinis tirpalas)	TB	2 ml
AdnaTest ColonCancerDetect	2 dėžutė		
Mėlyna	„AdnaTest PrimerMix ColonDetect“ (pradmenų mišinys „AdnaTest PrimerMix ColonDetect“)	PMC	144 µl
Oranžinė	„AdnaTest Positive Control Colon (C+)“ („AdnaTest“ storosios žarnos teigiama kontrolinė medžiaga (C+))	CONTROL +	56 µl
	Vadovas		1

„AdnaTest ColonCancerDetect“ 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 ColonCancerSelect

Įranga

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

Medžiagos

- „AdnaTube“ (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 aerosoliniais 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 ColonCancerDetect

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/s.
- „Agilent 2100“ bioanalizatorius („Agilent Technologies“)

Medžiagos

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

Reagentai

- „Sensiscript® RT Kit“ („Sensiscript® RT“ rinkinys (QIAGEN, kat. nr. 205211, 50 reakcijų)
 - **Pastaba:** „Sensiscript RT Kit“ („Sensiscript RT“ rinkinio) (kat. nr. 205211) užteks tik 25 mėginiams, nes kiekvienai reakcijai reikia dvigubo tūrio.
- „Recombinant RNasin, RNase-inhibitor, 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 ColonCancerDetect“ testui reikalingos „Hoffmann-La Roche AG“, Bazelyje, licencijos. Įsigijus „AdnaTest ColonCancerDetect“, naudotojui nesuteikiama teisė atlikti PGR be licencijos.

Reagentų laikymas ir naudojimas

Laikymas

„AdnaTest ColonCancer“ sistema pateikiama trijose dėžutėse. „AdnaTest ColonCancerSelect“ (kat. nr. 395422) ir „AdnaTest RNA Reagent Box 1“ („AdnaTest“ reagentų 1 dėžutė) (1 dėžutės kat. nr. 396422) turi būti laikomi 2–8 °C temperatūroje. Komponentų negalima naudoti pasibaigus tinkamumo laikui.

„AdnaTest ColonCancerDetect Box 2“ („AdnaTest ColonCancerDetect“ 2 dėžutė) (2 dėžutės kat. nr. 396422), kurioje yra „AdnaTest PrimerMix ColonDetec“ ir „AdnaTest“ teigiamos storosios žarnos 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

- „ColonSelect“ rutuliukuose yra natrio azido kaip konservanto. Natrio azidas yra citotoksinis, todėl prieš naudojant rutuliukus jį reikia pašalinti. (Žr. „Protokolas: Auglio ląstelių pagausinimas naudojant „AdnaTest ColonCancerSelect““, 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.
- „ColonSelect“ 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 ColonCancerSelect“ 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 antikoaguliantu (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 ColonCancerSelect“

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 „ColonSelect“ rutuliukus būtina juos nuplauti, kaip aprašyta toliau esančiame skyriuje „Procedūra A: „ColonSelect“ 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: „ColonSelect“ rutuliukų paruošimas

1. Kruopščiai išmaišykite „ColonSelect“ rutuliukus įsiurbdami ir lašindami pipete; nepurtykite!
2. Apskaičiuokite „ColonSelect“ 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 „ColonSelect“ 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 storosios žarnos vėžiu susijusios genų ekspresijos pagausintose auglio ląstelėse aptikimas naudojant „AdnaTest ColonCancerDetect“[™], 17 psl.) arba ląstelių lizatus laikykite –20 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 2 savaites.

Protokolas: su storosios žarnos vėžiu susijusios genų ekspresijos pagausintose auglio ląstelėse aptikimas naudojant „AdnaTest ColonCancerDetect“

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 pridodant 10 %), ir perpilkite apskaičiuotą tūrį į 1,5 ml reakcijų mėgintuvėlį be RNazės (nepateikiamas).
3. Įstatykite mėgintuvėlį į „AdnaMag-S“.
Pastaba: „AdnaMag-S“ magnetų slankiklį galima įstatyti naudojant dvi padėtis. Slankiklį visada įstatykite taip, kad balta plastikinė plėvelė būtų nukreipta į priekį ir magnetai būtų šalia reakcijų mėgintuvėlių.
4. Po 1 minutės išsiurbkite supernatantą pipete.
5. Plovimo veiksmai:
 - 5a. Iš „AdnaMag-S“ išimkite magnetų slankiklį.
 - 5b. Įlašinkite pradinį (2 veiksmas, 18 psl.) „AdnaTest“ lizės / susiejimo buferinio tirpalo tūrį į 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 perkeltkite 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 kompleksų!

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) nepriedant 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 psl.).
Perkelkite visą tūrį į 0,2 ml PGR reakcijos mėgintuvėlį, kuriame yra RT pagrindinio mišinio. Kruopščiai išmaišykite kelis kartus įsiurbdami ir lašindami pipete.

1 lentelė. Atvirkštinės transkripcijos reakcijos nustatymas

Komponentas	Tūris
RT pagrindinis mišinys	
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 RNazės 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 PGR“, 22 psl.

Protokolas: sudėtinė 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“ storosios žarnos teigiamą kontrolinę medžiagą, „AdnaTest PrimerMix ColonDetect“ ir vandenį be RNazės. Papurtykite, greitai centrifuguokite ir laikykite ant ledo.

Procedūra

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“ storosios žarnos 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 ColonDetect“ (pradmenų mišinys „AdnaTest PrimerMix ColonDetect“)	4,0 µl
cDNR arba RT kontrolinė medžiaga, arba neigiamą kontrolinė medžiaga (vanduo be RNazės), arba „AdnaTest“ storosios žarnos teigiama kontrolinė medžiaga, kiekvienos:	8,0 µl
Bendras 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 38 ciklus.

4 lentelė. PGR ciklų programa

Veiksmas	Laikas	Temperatūra
Pradinis aktyvinimo veiksmas	15 min.	95 °C
3 veiksmų ciklai		
Denatūracija	45 sek.	94°C
Prisijungimas	45 sek.	58°C
Išplėtimas	45 sek.	72°C
Galutinis išplėtimas:	10 min.	72°C
Vėsinimas	∞	4°C

Rezultatų aiškinimas

Fragmentų analizė „Agilent 2100“ bioanalizatoriumi

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

Rezultatų analizė

Tyrimas laikomas teigiamu, jei aiškiai aptinkamas bent vienas su vėžiu susijusio transkripto PGR fragmentas.

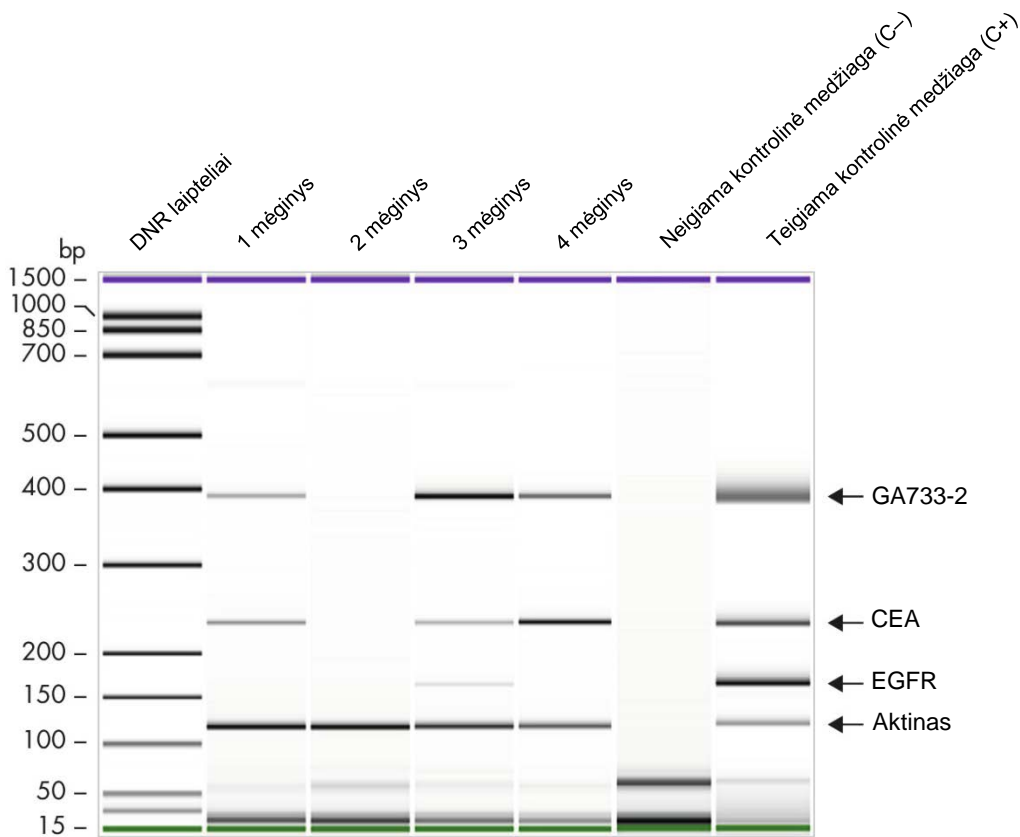
Jwi naudojate „Agilent 2100“ bioanalizatorių, viršūnės esant $\geq 0,10$ ng/ μ l koncentracijai yra teigiamos. (3 pav).

Kontrolinio geno aktino fragmentas turi būti matytis 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 900 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 mėginių „AdnaTest ColonCancerDetect“ rezultatai Pirmoje juostelėje parodytas DNR dydžio standartas (DNA laipteliai). 1 ir 4 mėginiai yra GA733-2 ir CEA teigiami, 2 mėginys yra neigiamas, o 3 mėginys yra GA733-2, CEA ir EGFR teigiamas. Aktinas aptiktas 1–4 mėginiuose. PGR neigiama (C–) ir teigiama kontrolinė medžiaga (C+) 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 ColonCancerSelect“ ir „AdnaTest ColonCancerDetect“ 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 10 išaugintų T84 storosios žarnos vėžio ląstelių buvo pridėtos į sveikų donorų kraujo mėginius, norint nustatyti atkūrimo rodiklius, gautus naudojant AdnaTest ColonCancerSelect/Detect (5 lentelė).

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

	Bendras mėginių skaičius	Teigiamų rezultatų skaičius	Atkūrimas
Į 5 ml kraujo pridėtos dvi vėžio ląstelės	63	48	76 %
Į 5 ml kraujo pridėta dešimt vėžio ląstelių	41	41	100 %

2 vėžio ląstelių, pridėtų į 5 ml sveikų donorų kraują, aptikimo atkūrimo rodiklis yra 76 %.

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

Specifiškumas

Analizuojant 106 sveikų donorų buvo naudojamas „AdnaTest ColonCancerSelect/Detect“ norint nustatyti klaidingai neigiamų rezultatų rodiklį esant nurodytai kritinei reikšmei (0,15 ng/μl kiekvieno įtraukto geno, išskyrus aktino, fragmentų koncentracijai).

6 lentelė. Specifikacijos nustatymas

Kontrolinės medžiagos	Bendras mėginių skaičius	Klaidingai teigiamų rezultatų skaičius	Specifiškumas (%)
Sveiki donorai	106	2 (2 %)	98

„AdnaTest ColonCancerSelect/Detect“ parodė 98 % specifiškumą (6 lentelė).

Rezultatų atkartojamumas

Į dvidešimt mėginių, gautų iš sveikų donorų, buvo pridėta po 10 T84 storosios žarnos vėžio ląstelių. Kad būtų nustatytas atkartojamumas, du operatoriai išanalizavo kraujo mėginius naudodami „AdnaTest ColonCancerSelect/Detect“. Vidinis tyrimo atkartojamumas ir atkartojamumas tarp tyrimų buvo 100 % (7 lentelė).

7 lentelė. „AdnaTest ColonCancer 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 ColonCancerDetect“. Du operatoriai išanalizavo 30 cDNR mėginių – buvo atlikti 3 nepriklausomi 10 mėginių matavimai. Vidinis tyrimo tikslumas ir tikslumas tarp tyrimų buvo 100 % (8 lentelė).

8 lentelė. „AdnaTest ColonCancerDetect“ tikslumas

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

Trukdančios medžiagos

Antikoagulantai

Imant ir transportuojant kraują būtina naudoti antikoagulantus. Tačiau pridėjus „AdnaTest“ imunomagnetinių rutuliukų dėl heparino ir citrato susidaro dariniai, dėl kurių gali būti negauti tyrimo rezultatai arba gauti klaidingai teigiami rezultatai. Tačiau EDTA ir ACDA (citrato / dekstrozės / adenino tirpalas A) yra suderinami su „AdnaTest“ imunomagnetiniais rutuliukais.

Hemolizė

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

Chemoterapijos, tikslinės terapijos vaistai ir antihormoniniai režimai

Chemoterapiniai vaistai (taksanai, cisplatina, oksaliplatina, 5-FU, antraciklinas, irinotekanas ir kt.) yra stiprūs citotoksinai ir pažeidžia arba greitai pražudo kraujo mėginyje esančias ląsteles. Dėl to, naudojant „AdnaTest“ imunomagnetinius rutuliukus, yra didelė tikimybė, kad bus gauti klaidingai neigiami rezultatai. Gavus šių medžiagų, žmogaus kūnui reikia maždaug 5–7 dienų, kad galėtų jas detoksikuoti (9 lentelė). Šiuo metu paimtų kraujo mėginių negalima naudoti su „AdnaTest“ imunomagnetiniais rutuliukais.

9 lentelė. Chemoterapinių vaistų pusamžis

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

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

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

Trukdančios sąlygos

Kraujo krešuliai

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

Gerybinė organinė liga ir lėtinės uždegiminės būklės

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

Ūmi alergija

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

Klinikiniai tyrimai

Išanalizuoti 18 pacientų, sergančių metastazavusiu storosios žarnos vėžiu, kraujo mėginiai, paimti prieš terapiją ir ankstyvame terapijos etape, kad būtų galima palyginti klinikinius CT duomenis (gautus praėjus 3 mėnesiams nuo terapijos pradžios) su AdnaTest rezultatais. Bendras CTC teigiamų rezultatų skaičius prieš terapiją buvo 67 % (12/18). Iš šių 12 pacientų 4 į terapiją nereagavo, 2 liga buvo stabili, o 6 reagavo (dalinė remisija). CTC išliko 75 % pacientų, kurie nereagavo, bet pacientų, kurie reagavo, grupėje per ankstyvąjį terapijos etapą išnyko 100 %. Šie rezultatai rodo, kad metastazavusio storosios žarnos vėžio CTC analizė yra ankstyvas atsako į terapiją indikatorius. (Lankiewicz et al. 2008).

Literatūra

Lankiewicz, S., Zimmermann, S., Hollmann, C., Hillemann, T., and Greten, T.F. (2008) Circulating tumour cells as a predictive factor for response to systemic chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Mol. Oncol.* **2**, 349–55.

Santrumpos

AdnaMag-L	Magnetinių dalelių koncentratorius (didelis)
AdnaMag-S	Magnetinių dalelių koncentratorius (mažas)
bp	Bazių poros
C+	Teigiama kontrolinė medžiaga
C-	Neigiamos kontrolinės medžiagos
cDNR	Komplementinė deoksiribonukleino rūgštis
CEA	Karcinoembrioninis antigenas
DNR	Deoksiribonukleino rūgštis
dNTPs	Deoksinukleotidų trifosfatai
EGFR	Epidermio augimo faktoriaus receptorius
GA733-2	Skrandžio ir žarnų auglys, susijęs su antigenu 733-2
kb	kilobazė
mRNR	Matricinė ribonukleino rūgštis
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 ColonCancerSelect	CTCs išskyrimui ir vėlesniam mRNR išskyrimui iš žmogaus viso kraujo, 12 paruošimų	395422
AdnaTest ColonCancerDetect	RT-PCR rinkinys, skirtas su storosios žarnos vėžiu susijusiai genų ekspresijai pagausintose auglio ląstelėse aptikti	396422
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 ColonCancerDetect“, 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 ColonCancerSelect“ ir „AdnaTest ColonCancerDetect“ ribotoji licencinė sutartis

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

1. Produktą galima naudoti tik vadovaujantis protokolais, pateiktais su šiuo produktu, šiuo vadovu ir tik su komplekte esančiais komponentais. QIAGEN nesuteikia jokios intelektualinės nuosavybės licencijos naudoti ar įtraukti pridėtus šio komplekto komponentus su į šį rinkinį neįeinančiais komponentais, išskyrus aprašytus protokoluose, pateiktuose su šiuo produktu, šiame vadove ir papildomuose protokoluose, esančiuose www.qiagen.com. QIAGEN vartotojams pateikiami keli papildomi protokolai. Šiuos protokolus QIAGEN kruopščiai patikrino ir optimizavo. QIAGEN neteikia garantijų, kad šie protokolai nepažeidžia trečiųjų šalių teisių.
2. Išskyrus licencijose nurodytus atvejus, QIAGEN nesuteikia garantijos, kad šis 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 nesimti ir neleisti niekam kitam imtis veiksmų, kurie galėtų paskatinti arba palengvinti čia nurodytus draudžiamus veiksmus. QIAGEN gali priversti vykdyti šios Ribotosios licencinės sutarties draudimus bet kuriame teisme ir atgauti visas tyrimo ir teismo išlaidas, įskaitant išlaidas advokatams, pateikusi ieškinį dėl šios Ribotosios licencinės sutarties vykdymo arba su šiuo komplektu ir (arba) jo komponentais susijusių teisių į savo intelektualinę nuosavybę.

Atnaujintas licencijos sąlygas žr. www.qiagen.com.

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

HB-2343-001 © 2017 QIAGEN. Visos teisės saugomos.

Šis puslapis specialiai paliktas tuščias

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