

Březen 2017

Manuál k AdnaTest ColonCancerSelect a ColonCancerDetect



12 (katalogové číslo 395422)



12 (katalogové číslo 396422)

K obohacení nádorových buněk z celé krve pacientů s karcinomem tlustého střeva a detekci genové exprese spojené s karcinomem tlustého střeva v obohacených nádorových buňkách.

Pro diagnostiku in vitro.

Verze 1



395422 (AdnaTest ColonCancerSelect)

396422 (AdnaTest ColonCancerDetect)



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
NĚMECKO



1106497CZ

Sample to Insight



Obsah

Účel použití.....	4
Shrnutí a vysvětlení.....	4
Princip metody.....	5
AdnaTest ColonCancerSelect	5
AdnaTest ColonCancerDetect.....	6
Dodávané materiály.....	7
Obsah soupravy	7
Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky	8
AdnaTest ColonCancerSelect	9
AdnaTest ColonCancerDetect.....	9
Upozornění a bezpečnostní opatření	11
Bezpečnostní informace.....	11
Informace o použití.....	11
Patenty.....	11
Skladování činidel a manipulace s nimi	12
Skladování	12
Manipulace.....	12
Manipulace se vzorky a jejich uložení	13
Příprava vzorku	13
Protokol: Obohacení nádorových buněk pomocí testu AdnaTest ColonCancerSelect	14
Protokol: Detekce genové exprese související s nádorem tlustého střeva vyjádřeného v obohacených nádorových buňkách pomocí AdnaTest ColonCancerDetect	17

Protokol: Multiplex PCR.....	22
Interpretace výsledků	24
Analýza fragmentu na Agilent 2100 Bioanalyzer.....	24
Řešení problémů.....	27
Kontrola kvality	27
Omezení.....	27
Charakteristika účinnosti	28
Záchyt	28
Specifická.....	28
Reprodukovatelnost	29
Přesnost.....	29
Interferující látky.....	30
Interferující podmínky.....	31
Klinické studie	32
Literatura	32
Zkratky.....	33
Symboly.....	33
Informace pro objednání.....	34

Účel použití

AdnaTest ColonCancerSelect je in vitro diagnostická metoda určená k imunochemickému obohacení obíhajících nádorových buněk z antitrombotických vzorků celé krve získaných od pacientů s rakovinou tlustého střeva kombinací epiteliálních a nádorových antigenů.

AdnaTest ProstateColonDetect je in vitro diagnostická zkouška určená k analýze profilů genové exprese nádorových buněk reverzní transkripcí a metodou multiplex PCR a následnou denzitometrickou analýzou PCR produktů automatizovanou kapilární elektroforézou využívající Bioanalyzer Agilent® 2100.

AdnaTest ColonCancerSelect/Detect není určen ke screeningovým účelům a nemá se používat jako diagnostická zkouška k potvrzení přítomnosti karcinomu tlustého střeva.

Tento produkt je určen pro použití profesionálními uživateli, např. techniky a lékaři vyškolenými v technikách molekulární biologie.

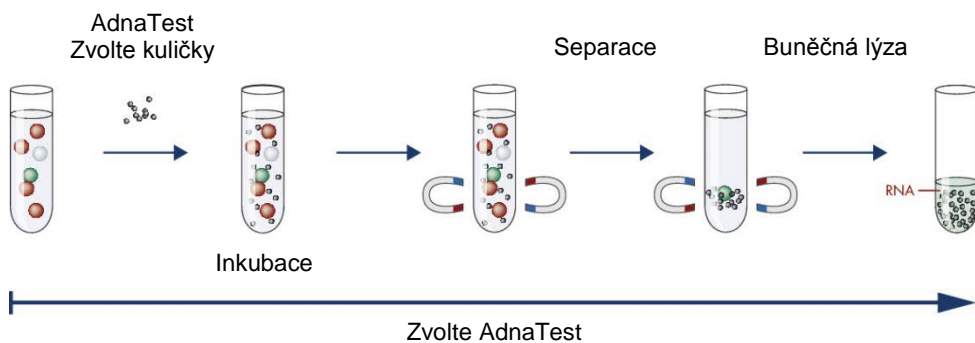
Shrnutí a vysvětlení

Test AdnaTest ColonCancerSelect umožňuje imunomagnetické obohacování nádorových buněk pomocí epitelových a nádorových antigenů. Test AdnaTest ColonCancerDetect je určen pro analýzu genové exprese související s nádorem tlustého střeva v imunomagneticky obohacených nádorových buňkách pomocí reverzní transkripce a PCR.

Princip metody

AdnaTest ColonCancerSelect

Protilátky proti epitelovým a nádorovým antigenům jsou konjugovány na magnetické kuličky, což umožní označení nádorových buněk v plné krvi. Označené buňky jsou extrahovány koncentrátorem magnetických částic (AdnaMag-L a AdnaMag-S) a následně lyzovány (obr. 1 a 2).



● Krevní buňky ● Nádorové buňky

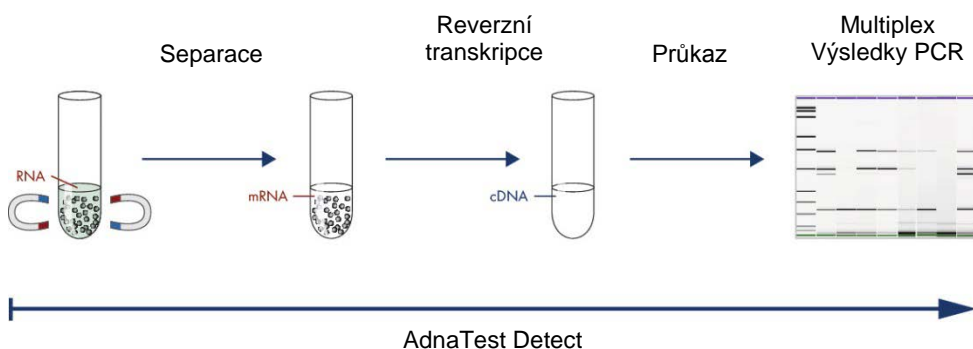
⊗ Magnetické kuličky potažené protilátkou nebo Oligo(dT)25

Obrázek 1. Test AdnaTest ColonCancerSelect: Imunomagnetická selekce buněk s několika protilátkami spojenými s nádorem.

Buněčný lyzáát prochází další analýzou testem AdnaTest ColonCancerDetect.

AdnaTest ColonCancerDetect

Test AdnaTest ColonCancerDetect obsahuje kuličky potažené Oligo (dT)₂₅ pro izolaci mRNA z lyzátu předem obohacených nádorových buněk. Reverzní transkripcí vzniká cDNA, která se následně používá jako templát pro detekci a charakterizaci nádorových buněk pomocí testu Multiplex-PCR. Součástí testu AdnaTest PrimerMix ColonDetect umožňuje amplifikaci tří nádorových antigenů a jednoho kontrolního genu.



● Krevní buňky ● Nádorové buňky

⊗ Magnetické kuličky potažené protilátkou nebo Oligo(dT)₂₅

Obrázek 2. AdnaTest ColonCancerDetect: Multiplex PCR různých nádorových markerů spojených s rakovinou. Ve druhém kroku jsou obohacené buňky vyšetřeny RT-PCR na nádorové expresivní vzorce.

Vláčna mRNA jsou reverzně přepsána do cDNA. Následně může být několik spojených nádorových markerů zesíleno pomocí multiplex PCR a vizualizováno.

Primery tvoří fragmenty těchto velikostí:

- GA733-2: 395 bp
- CEA: 231 bp
- EGFR: 163 bp
- Aktin: 120 bp (interní kontrola PCR)

Poznámka: Velikosti fragmentů se mohou mírně lišit. K vyhodnocení zjištěných signálů, prosím, použijte pozitivní kontrolu tlustého střeva testu AdnaTest.

Dodávané materiály

Obsah soupravy

AdnaTest ColonCancerSelect			
Katalogové číslo		395422	
Počet testů		12	
Sběrné zkumavky	Collection Tubes (Sběrné zkumavky) (1,5 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	3 x 5
Sběrné zkumavky	Collection Tubes (Sběrné zkumavky) (15 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	24
Červená	ColonSelect Beads (Kuličky ColonSelect)	CSB	1,2 ml
Červená	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (Lytický/vazebný pufr)	LBB	2 x 1,2 ml
	Handbook (Příručka)		1

AdnaTest ColonCancerDetect			
Katalogové číslo	396422		
Počet testů	12		
AdnaTest RNA Reagenty			Schránka 1
Červená	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (Lytický/vazebný pufr)	LBB	2 ml
Oranžová	Oligo(dT) ₂₅ Beads (Kuličky Oligo (dT) ₂₅)	OdT	280 µl
Bílá	RNA Purification Buffer A (RNA Purifikační pufr A)	BA	4ml
Bílá	RNA Purification Buffer B (RNA Purifikační pufr B)	BB	4ml
Fialová	Tris-HCL Buffer (Tris-HCL pufr)	TB	2 ml
AdnaTest ColonCancerDetect			Schránka 2
Modrá	AdnaTest PrimerMix ColonDetect	PMC	144 µl
Oranžová	AdnaTest Positive Control AR (C+) (Pozitivní kontrola AR (C+))	CONTROL +	56 µl
	Handbook (Příručka)		1

Činidla AdnaTest ColonCancerDetect postačí na analýzu 6 PCR kontrol a 12 krevních vzorků.

Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázově použitelné rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (safety data sheets, SDS), které obdržíte od dodavatele výrobku.

AdnaTest ColonCancerSelect

Vybavení

- Tube rotator for 15 ml and 1.5 ml tubes (Rotátor zkumavek pro 15 ml a 1,5 ml zkumavky) (např. ELMi Ltd., katalogové č. IMIX-03)
- Koncentrátory magnetických částic
 - AdnaMag-L (kat. č. 399921)
 - AdnaMag-S (kat. č. 399911)

Materiál

- AdnaTube (zkumavky AdnaTube) (kat. č. 399932), při práci se zkumavkami BD Vacutainer[®] ACD-A
- Sterilní 10 ml skleněné nebo plastové pipety bez RNázy a pipetor
- Sterile, RNase-free 1.5 ml reaction tubes (sterilní 1,5 ml reakční zkumavky) bez RNázy (např. Sarstedt, kat. č. 72.690)
- Pipety a pipetovací špičky bez RNázy s aerosolovou bariérou vhodné k pipetování objemů 100 µl až 1000 µl

Reagencie

- Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.0–7.3 (Fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS), pH 7,0 -7,3) (např. Fisher, kat. č. VX14190169, D-PBS)

AdnaTest ColonCancerDetect

Vybavení

- Tube rotator for 1.5 ml tubes (rotátor zkumavek pro 1,5ml zkumavky) (např. ELMi Ltd., kat. č. IMIX-03)

- Magnetic particle concentrator AdnaMag-S (koncentrátor magnetických částic AdnaMag-S) (kat. č. 399911)
- Termoblok nebo vodní lázeň (50°C)
- Termocykler s vyhříváním víkem a rychlostí ohřevu 2°C/s.
- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)

Materiál

- Sterilní tenkostěnné 0,2 ml PCR zkumavky bez RNázy
- Sterile, RNase-free 1.5 ml reaction tubes (sterilní 1,5 ml reakční zkumavky) bez RNázy (např. Sarstedt, kat. č. 72.690)
- Pipety a pipetovací špičky bez RNázy s aerosolovou bariérou vhodné k pipetování objemů 1 µl až 200 µl

Reagencie

- Sensiscript[®] RT Kit (Souprava pro reverzní transkripci Sensiscript[®]) (QIAGEN, kat.č. 205211, 50 reakcí)
 - **Poznámka:** Sensiscript RT Kit (souprava pro reverzní transkripci Sensiscript) (kat. č. 205211) postačí pouze pro 25 vzorků, protože pro každou reakci je nutný dvojnásobný objem.
- Recombinant RNasin, RNase-inhibitor, 2,500 U (rekombinantní RNasin, inhibitor RNázy, 2500 U) (Promega, kat. č. N2511)
- HotStarTaq[®] Master Mix (souprava HotStarTaq[®] Master Mix) (QIAGEN, kat. č. 203443, 250 U)
- Drcený led

Upozornění a bezpečnostní opatření

Pro diagnostiku in vitro

Bezpečnostní informace

Při manipulaci s chemikáliemi noste vždy laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (SDS). Jsou k dispozici také online v PDF formátu na stránkách **www.qiagen.com/safety**, kde můžete najít, přečíst a vytisknout bezpečnostní listy všech souprav a součástí souprav QIAGEN.

Vzorky a odpad z analýzy zlikvidujte v souladu s místními bezpečnostními předpisy.

Informace o použití

Tyto testy může provádět pouze personál vyškolený v technikách molekulární biologie.

Patenty

Test AdnaTest ColonCancerDetect vyžaduje licence společnosti Hoffmann-La Roche AG, Basel. Zakoupení testů AdnaTest ColonCancerDetect uživatele neoprávněuje provádět PCR bez licence.

Skladování činidel a manipulace s nimi

Skladování

Systém AdnaTest ColonCancer je dodáván ve třech krabičkách. AdnaTest ColonCancerSelect (kat. č. 395422) a AdnaTest RNA Reagent krabice 1 (krabice 1 kat. č. 396422) musí být skladována při teplotě 2–8°C. Komponenty nesmí být používány po uplynutí doby použitelnosti.

AdnaTest ColonCancerDetect krabice 2 (krabice 2 kat.č. 396422) obsahující AdnaTest PrimerMix ColonDetect a AdnaTest pozitivní kontrolu tlustého střeva, musí se skladovat zvlášť při teplotě –30 až –15°C. K zabránění možné kontaminace a opakovaných změn teploty rozdělte poměrně základní směs. Součásti nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti.

Manipulace

- Kuličky ColonSelect obsahují jako ochrannou látku azid sodný. Azid sodný je cytotoxický a proto je nutné ho odstranit před použitím kuliček. (Viz „Protokol: Obohacení nádorových buněk pomocí testu AdnaTest ColonCancerSelect“, strana 14.)
- Všechny součásti a další činidla od jiných dodavatelů je nutné uchovávat podle jejich pokynů. Platí bezpečnostní pokyny příslušných výrobců.
- Aby nedošlo ke kontaminaci DNA, RNA a RNázou, používejte ochranné rukavice.
- Kuličky ColonSelect rozdělte na alikvotní podíly, aby nedošlo ke kontaminaci.
- Test se musí provést v daném pořadí a časy a teploty inkubace musí odpovídat všem příslušným uvedeným specifikacím.
- Jestliže při obohacování buněk dojde k aglutinaci kuliček, vzorky zlikvidujte.

- Aby nedošlo ke zkřížené kontaminaci, proveďte pokud je to možné zpracování vzorků včetně reverzní transkripce a následnou analýzu amplifikovaných PCR produktů v oddělených místnostech.
- Použití výrobků jiných než doporučených dodavatelů může mít za následek horší výsledky.
- Je třeba dodržovat laboratorní bezpečnostní a hygienické předpisy (např. laboratorní oděv, ochranné brýle a rukavice).

Manipulace se vzorky a jejich uložení

Příprava vzorku

- Krevní vzorky je nutné odebrat před použitím terapeutických látek. Test AdnaTest ColonCancerSelect nepoužívejte dříve než 7 dní po posledním léčebném zásahu!
- Odběr krve: Pokud je přeprava vzorku kratší než 4 hodiny, použijte zkumavky obsahující EDTA jako antikoagulans (např. S Monovette[®] K3 EDTA, Sarstedt [kat.č. 01.1605.001]) k odběru alespoň 7,5 ml plné krve.
- Pokud je přeprava vzorku delší než 4 hodiny, použijte zkumavky BD Vacutainer ACD-A Tubes (Becton Dickinson GmbH, kat.č. 366645 [EU]; 364606 [US]) k odběru alespoň 8,5 ml plné krve. Před dalším zpracováním pomocí AdnaTest musí být 5 ml ACD-A krve přeneseno do zkumavky na vzorky AdnaTube, kat. č. 399932.
- Krev je nutné okamžitě uchovat při 4 °C.
- Vzorky je nutné zpracovat co nejdříve, ale nejpozději 4 hodiny po odběru krve při použití standardních EDTA zkumavek nebo do 30 hodin při použití zkumavek na sběr krve BD Vacutainer v kombinaci se zkumavkami AdnaTubes.
- Nesmí dojít k hemolýze krve.

Protokol: Obohacení nádorových buněk pomocí testu AdnaTest ColonCancerSelect

Důležité body, než začnete

- Před zahájením postupu si přečtěte „Upozornění a bezpečnostní opatření“ (strana 11), „Skládování činidel a manipulace s nimi“ (strana 12) a „Manipulace se vzorky a jejich uložení“ (strana 13).
- Před použitím je nutné promytím kuliček ColonSelect odstranit azid sodný podle postupu popsaného níže v „Postup A: Příprava kuliček ColonSelect“.
- Použijte dodané 1,5 ml sběrné zkumavky pouze pro označený krok protokolu.

Co je třeba udělat, než začnete

- Zajistěte, aby byl pufr AdnaTest Lysis/Binding vytemperován na pokojovou teplotu. Jestliže pozorujete usazeniny, vytemperujte pufr na teplotu laboratoře a míchejte jej, dokud se usazeniny zcela nerozpustí.

Postup A: Příprava kuliček ColonSelect

1. Důkladným pipetováním resuspendujte kuličky ColonSelect; nevortexujte!
2. Vypočtete objem kuliček ColonSelect nutný pro všechny zpracované vzorky (100 µl na vzorek) a přeneste vypočtený objem do 1,5 ml reakční zkumavky (není součástí dodávky).

Jestliže zpracováváte více než 10 vzorků, použijte další 1,5 ml reakční zkumavky.

3. Vložte zkumavku do AdnaMag-S.
4. Po 1 minutě odstraňte supernatant pomocí pipety.

Poznámka: Při odstraňování supernatantu se nedotýkejte kuliček!

5. Kroky promývání:

5a. Z AdnaMag-S vyjměte magnetický posuvník.

- 5b. Přidejte 1 ml PBS a opakovaným pipetováním resuspendujte kuličky.
 - 5c. Vložte magnetický posuvník zpět do AdnaMag-S.
 - 5d. Po 1 minutě odstraňte zcela supernatant pomocí pipety.
 - 5e. Opakujte dvakrát kroky 5a až 5d (celkem tři promytí).
6. Vyjměte zkumavku z AdnaMag-S a resuspendujte kuličky v PBS na původní objem (100 µl na vzorek). Pokračujte „Postup B: Výběr nádorových buněk“, dole.

Postup B: Výběr nádorových buněk

1. Při použití standardních EDTA zkumavek pipetujte 5 ml vzorku krve do 15ml sběrné zkumavky (zkumavka je součástí).

Při použití krve ACD-A ve zkumavce BD Vacutainer ACD-A přeneste 5 ml krve do AdnaTube.

Poznámka: AdnaTubes jsou povinné při použití zkumavek BD Vacutainer ACD-A.

2. Pipetováním důkladně resuspendujte kuličky ColonSelect (připravené v kroku 6 postupu A) a 100 µl těchto kuliček přidejte do každého vzorku krve.
3. Pomalu otáčejte zkumavkami (asi 5 ot./min) po dobu 30 minut při teplotě laboratoře na zařízení, které umožňuje jak naklánění, tak otáčení.
4. Vložte zkumavky do AdnaMag-L bez magnetického posuvníku. Pohybem AdnaMag-L směrem dolů uvolněte kapky krve zachycené ve víčku.
5. Vložte magnetický posuvník a inkubujte zkumavky v AdnaMag-L po dobu 3 minuty při teplotě laboratoře.
6. 10 ml pipetou zcela odstraňte krevní supernatant, aniž byste se dotkli kuliček.

Poznámka: Při odstraňování supernatantu se nedotýkejte kuliček!

7. Kroky promývání:

- 7a. Z AdnaMag-L vyjměte magnetický posuvník.
- 7b. Přidejte 5 ml PBS. Uzavřete zkumavky a opatrným protřepáním AdnaMag-L 5krát tam a zpět resuspendujte komplexy magnetických kuliček s buňkami.
- 7c. Pohybem AdnaMag-L se zkumavkami dvakrát směrem dolů uvolněte kapky zachycené ve víčku.

- 7d. Vložte magnetický posuvník do AdnaMag-L a inkubujte 1 minutu při teplotě laboratoře.
- 7e. Pipetou zcela odstraňte supernatant.
- 7f. Opakujte dvakrát kroky 7a až 7e (celkem tři promytí).
8. Z AdnaMag-L vyjměte magnetický posuvník.
9. Resuspendujte komplexy magnetických kuliček s buňkami v 1 ml PBS a přeneste každý vzorek do 1,5 ml reakční zkumavky (není součástí dodávky).
10. Reakční zkumavky vložte do AdnaMag-S s magnetickým posuvníkem.
Poznámka: Magnetický posuvník je možné do AdnaMag-S vložit dvěma způsoby. Vždy vkládejte posuvník bílým plastovým filmem směrem dopředu, abyste se ujistili, že magnety jsou v blízkosti reakčních zkumavek.
11. Po 1 minutě pipetou zcela odstraňte supernatant, aby optimálně proběhla následná buněčná lyze.
12. Z AdnaMag-S vyjměte magnetický posuvník.
13. Do každé reakční zkumavky přidejte 200 µl lytického/vazebného pufru (vytemperovaného na teplotu laboratoře). Nejméně 5krát pipetujte, aby došlo k resuspendaci.
14. Magnetický posuvník vložte do AdnaMag-S a inkubujte 1 minutu.
15. Přeneste každý supernatant (buněčný lyzát) do nové 1,5 ml reakční zkumavky.
16. Zlikvidujte zkumavky s kuličkami.
17. Okamžitě pokračujte s izolací mRNA (viz „Protokol: Detekce genové exprese související s nádorem tlustého střeva vyjádřeného v obohacených nádorových buňkách pomocí AdnaTest ColonCancerDetect“, strana 17) nebo uchovejte buněčné lyzáty při – 20 °C nejdéle 2 týdny.

Protokol: Detekce genové exprese související s nádorem tlustého střeva vyjádřeného v obohacených nádorových buňkách pomocí AdnaTest ColonCancerDetect

Důležité body, než začnete

- Před zahájením postupu si přečtete „Upozornění a bezpečnostní opatření“ (strana 11), a „Skladování činidel a manipulace s nimi“ (strana 12).
- Postupy A až C popisují izolaci mRNA a reverzní transkripci.
- Použijte dodané 1,5 ml sběrné zkumavky pouze pro označený krok protokolu.

Co je třeba udělat, než začnete

- Zajistěte, aby byl pufr AdnaTest Lysis/Binding vytemperován na pokojovou teplotu. Jestliže pozorujete usazeniny, vytemperujte pufr na teplotu laboratoře a míchejte jej, dokud se usazeniny zcela nerozpustí.
- Vytemperujte RNA purifikační pufr A a RNA purifikační pufr B na teplotu laboratoře. Umístěte Tris-HCl pufr na led.
- Rozpusťte 10x pufr RT a dNTPs ze soupravy pro reverzní transkripci Sensiscript při teplotě laboratoře. Vortexujte. Krátce odstředte a uložte na led. Rozmrazte vodu bez RNázy (součást soupravy pro reverzní transkripci Sensiscript).
- Nastavte termoblok nebo vodní lázeň na 50°C.

Postup A: Příprava kuliček Oligo(dT)₂₅

1. Důkladným pipetováním resuspendujte Oligo(dT)₂₅; Nepoužívejte třepačku!
2. Vypočtete objem kuliček nutný pro všechny zpracované vzorky (20 µl na vzorek plus 10%) a přeneste vypočtený objem do 1,5 ml reakční zkumavky bez RNázy (není součástí dodávky).
3. Vložte zkumavku do AdnaMag-S.
Poznámka: Magnetický posuvník je možné do AdnaMag-S vložit dvěma způsoby. Vždy vkládejte posuvník bílým plastovým filmem směrem dopředu, abyste se ujistili, že magnety jsou v blízkosti reakčních zkumavek.
4. Po 1 minutě odstraňte supernatant pomocí pipety.
5. Kroky promývání:
 - 5a. Z AdnaMag-S vyjměte magnetický posuvník.
 - 5b. Přidejte původní objem (krok 2, strana 18) lytického/vazebního pufru a opakovaným pipetováním resuspendujte kuličky. Resuspendaci provádějte opatrně, aby nedošlo ke zpěnění.
 - 5c. Vložte magnetický posuvník do AdnaMag-S.
 - 5d. Po 1 minutě zcela odstraňte supernatant.
 - 5e. Opakujte dvakrát kroky 5a až 5d (celkem dvě promytí).
6. Vyjměte zkumavku z AdnaMag-S a resuspendujte kuličky v lytickém/vazebním pufru AdnaTest na původní objem (krok 2, strana 18). Pokračujte „Postup B: izolace mRNA“.

Postup B: izolace mRNA

1. Přidejte 20 µl Oligo(dT)₂₅ kuliček (krok 6, nahoře) do každé zkumavky obsahující buněčný lyzát (krok 15, strana 16).
2. Pomalu otáčejte zkumavkami (asi 5 ot./min) po dobu 10 minut při teplotě laboratoře na zařízení, které umožňuje jak naklánění, tak otáčení.
3. Zkumavky vložte do AdnaMag-S bez magnetického posuvníku. Pohybem AdnaMag-S směrem dolů uvolněte kuličky a kapalinu zachycenou ve víčku.

4. Vložte magnetický posuvník a po 1 minutě odstraňte supernatanty.
5. Kroky promývání 1:
 - 5a. Z AdnaMag-S vyjměte magnetický posuvník.
 - 5b. Do každé zkumavky přidejte 100 µl promývacího pufru A a opakovaným pipetováním resuspendujte kuličky. Aby nedošlo ke ztrátě žádných kuliček, důkladně opláchněte víčko a stěnu zkumavky.
 - 5c. Vložte magnetický posuvník do AdnaMag-S.
 - 5d. Po 1 minutě zcela odstraňte supernatant.
 - 5e. Opakujte dvakrát kroky 5a až 5d (celkem dvě promytí).
6. Kroky promývání 2
 - 6a. Z AdnaMag-S vyjměte magnetický posuvník.
 - 6b. Do každé zkumavky přidejte 100 µl RNA promývacího pufru B. Pipetováním resuspendujte kuličky a přeneste do nových 1,5 ml reakčních zkumavek (dodáno).
 - 6c. Vložte magnetický posuvník do AdnaMag-S.
 - 6d. Po 1 minutě zcela odstraňte supernatant. Tento krok je nutné provádět velmi pečlivě (sledujte peletu), protože kuličky mohou klouzat a omylem může dojít k jejich odstranění.
 - 6e. Opakujte jednou kroky 6a až 6d ve stejných reakčních zkumavkách (celkem dvě promytí).
7. Z AdnaMag-S vyjměte magnetický posuvník.
8. Do každé zkumavky přidejte 100 µl ledově studeného Tris-HCL pufru a pipetováním resuspendujte kuličky.
9. Vložte magnetický posuvník do AdnaMag-S.
10. Po 1 minutě zcela odstraňte supernatant.
11. Z AdnaMag-S vyjměte magnetický posuvník.
12. Resuspendujte komplex mRNA/kuličky v 29,5 µl vody bez RNázy.
13. Přeneste zkumavky do termobloku nebo vodní lázně a inkubujte 5 minut při 50°C.
14. Zkumavky okamžitě položte na led na nejméně 2 minuty.

15. Pokračujte ihned (do 5 minut) reverzní transkripcí (Postup C: Reverzní transkripce pomocí soupravy Sensiscript RT.).

Komplex mRNA/kuličky neuchovávejte!

Postup C: Reverzní transkripce pomocí soupravy Sensiscript RT.

1. Připravte RT Master Mix na ledu. RT Master Mix se připravuje dle tabulky 1 podle počtu vzorků.

Objem RT Master Mixu by měl být o 10% větší, než jste vypočítali pro celkový počet reakcí reverzní transkripce. Vždy je nutné připravit reakci negativní kontroly bez přidání mRNA (kontrola RT).

2. Vortexujte RT Master Mix. Krátce odstředěte a pipetujte 10,5 µl pro každou reakci do 0,2 ml PCR zkumavek.

3. Opatrně pomocí pipety resuspendujte komplexy mRNA/kuličky (krok 10, strana 19). Přeneste celkový objem do 0,2 ml PCR reakční zkumavky obsahující RT Master Mix. Opakovaným pipetováním důkladně promíchejte.

Tabulka 1. Nastavení reakce reverzní transkripce

Součást	Objem
RT Master Mix	
10x pufr RT	4,0 µl
dNTP Mix (5 mM každý dNTP)	4,0 µl
Inhibitor RNázy, 40 U/µl (Promega)	0,5 µl
Reverzní transkriptáza Sensiscript	2,0 µl
Templátová RNA*	29,5 µl
Komplex mRNA/kuličky nebo vody bez RNázy	
Celkový objem	40,0 µl

* Jako kontrolu RT přidejte místo komplexu mRNA/kuličky 29,5 µl vody bez RNázy. Objem komplexu mRNA/kuličky se může mírně lišit. Při reakci reverzní transkripce vždy používejte tento celkový objem.

4. cDNA se syntetizuje v termocykleru za následujících podmínek (tabulka 2).

Tabulka 2. Program reverzní transkripce

Krok	Čas	Teplota
Reverzní transkripce	60 minut	37°C
Denaturace	5 minut	93°C
Chlazení	∞	4°C

5. Reakční zkušavky s cDNA uložte na led nebo je můžete uchovat při max. –20 °C nejdéle 4 týdny.
6. Pokračujte s „Protokol: Multiplex PCR“, strana 22.

Protokol: Multiplex PCR

Důležitý bod před zahájením

- Před zahájením postupu si přečtěte „Upozornění a bezpečnostní opatření“ (strana 11), a „Skladování činidel a manipulace s nimi“ (strana 12).

Co je třeba udělat, než začnete

- Nechejte rozmrazit HotStarTaq Master Mix (QIAGEN), AdnaTest pozitivní kontrolu tlustého střeva, AdnaTest PrimerMix ColonDetect a vobu bez RNázy. Krátce odstředěte a uložte na led.

Postup

1. PCR Master Mix se připravuje dle tabulky 3 podle počtu vzorků.

Objem PCR Master Mixu by měl být alespoň o 10 % větší než požadavek vypočítaný na základě počtu vzorků. Pamatujte, že vždy je nutné zařadit AdnaTest pozitivní kontrolu tlustého střeva, vodu bez RNázy jako negativní kontrolu a RT kontrolu.

2. Pro každou přípravu nadávkujte 42,0 µl PCR Master Mixu do 0,2 ml PCR reakčních zkumavek. Pipetováním resuspendujte směs cDNA/kuličky a přidejte jí 8,0 µl do každé reakční zkumavky.

Poznámka: Jako negativní kontrolu přidejte místo cDNA 8,0 µl vody bez RNázy.

Tabulka 3. Příprava Multiplex-PCR

Součást	Objem
Multiplex PCR master mix	
HotStarTaq master mix	25,0 µl
Voda bez RNázy	13,0 µl
AdnaTest PrimerMix ColonDetect	4,0 µl
cDNA nebo RT kontrola nebo negativní kontrola (voda bez RNázy) nebo AdnaTest Positive Control (Pozitivní kontrola) každá:	8,0 µl
Celkový objem	50,0 µl

3. Pro PCR se používá termocykler podle programu popsaného v tabulce 4. Spustíte termocykler s nárůstem teploty 2°C/s. Během PCR proběhne celkem 38 cyklů.

Tabulka 4. PCR program cyklování

Krok	Čas	Teplota
Iniciační aktivační krok	15 minut	95°C
Cyklování ve 3 krocích:		
Denaturace	45 sekund	94°C
Hybridizace	45 sekund	58°C
Polymerizace	45 sekund	72°C
Konečná elongace	10 minut	72°C
Chlazení	∞	4°C

Interpretace výsledků

Analýza fragmentu na Agilent 2100 Bioanalyzer

Doporučujeme analýzu pomocí Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) na DNA 1000 LabChip®. Postupujte podle pokynů v příručce k DNA 1000 LabChip a dbejte na to, aby nedošlo k přenosu kuliček do LabChip. Magnetické kuličky v gelu mohou být příčinou nesprávných výsledků.

1. Spustíte software přístroje Bioanalyzer „2100 expert“. Zvolte **„Instrument“** (Nástroj) pod **„Contexts“** (Prostředí) a pak klikněte na tlačítko **„Assay“** (Test) vedle **„Assay Selection“** (Volba testu).
2. Zvolte **„Electrophoresis“** (Elektroforéza) > **DNA 1000 Series II.xsy**. Připravte čip a spustíte cyklus.
3. Pro vyhodnocení výsledků nastavte prahovou hodnotu detekce:
 - 3a. Zvolte **„Data“** (Údaje) pod **„Contexts“** (Prostředí) a pak klikněte na tabulku **„Assay Properties“** (Vlastnosti testu) tab. Zvolte **„Global“** (Celkově) a **„Normal“** (Normálně) z rozevírací nabídky vpravo.
 - 3b. Zvolte **„Sample Setpoints“** (Nastavovací hodnoty vzorku) > **„Integrator“** (Integrátor) > **„height threshold (FU)“** (Prahová výška) (Nastavené body vzorku > Integrátor > prahová hodnota výšky píku) a abyste mohli detekovat všechny signály, nastavte tuto hodnotu na **0** (výchozí hodnota je **20**).

Analýza výsledků

Test je pozitivní, pokud je jasně detekován PCR fragment nejméně jednoho nádorového transkriptu.

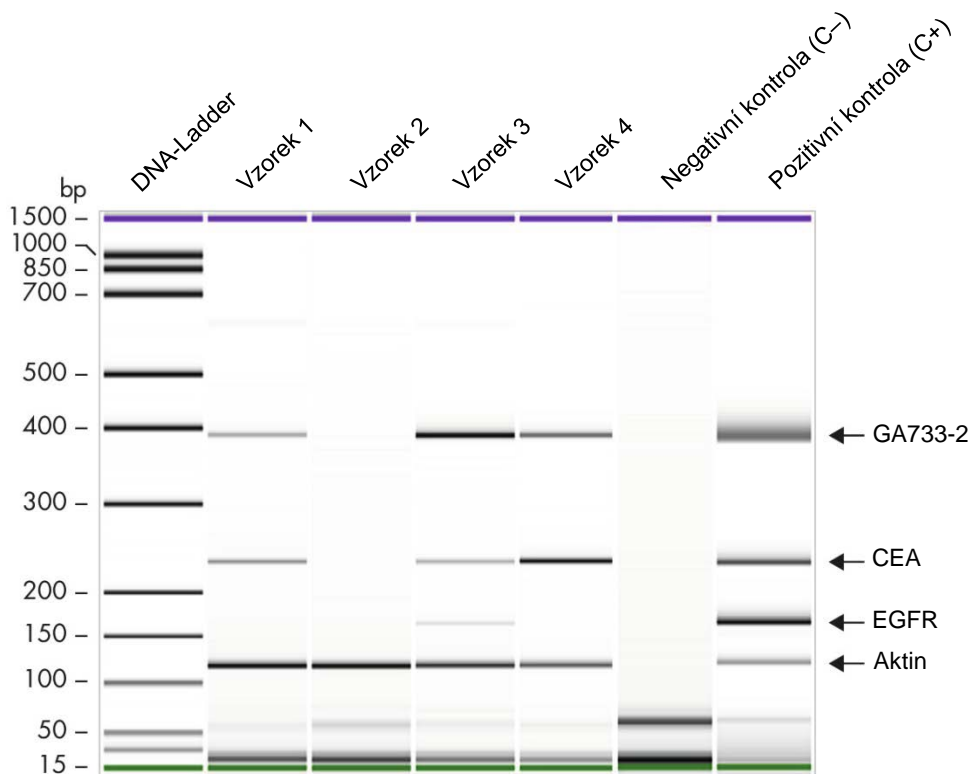
Pokud používáte Agilent 2100 Bioanalyzer jsou maxima s koncentrací $\geq 0,10$ ng/ μ l pro pozitivní (obr. 3).

Fragment kontrolního genu pro aktin musí být detekován ve všech vzorcích pacientů (interní kontrola PCR). Signál aktinu poskytuje pozitivní kontrolu úspěšné separace buněk, reverzní transkripce a Multiplex-PCR. Vzorky negativní kontroly a RT kontroly nesmí vykázat žádné pásy delší než 80 párů bází (dimery primerů).

Fragment větší než 900 bp značí kontaminaci genomickou DNA, což znamená, že během separace buněk došlo k problému. Výsledky jsou v takovém případě neplatné.

DŮLEŽITÉ: Pokud není protokol přesně dodržen, může to mít za následek falešně negativní nebo falešně pozitivní výsledky.

Je-li třeba s interpretací výsledků pomoci, obraťte se na náš tým podpory.



Obrázek 3. Výsledky vzorků testu AdnaTest ColonCancerDetect analyzovaných na analyzátoru Agilent 2100 Bioanalyzer. První pruh ukazuje hmotnostní standard DNA (DNA-Ladder). Vzorky 1 a 4 jsou pozitivní na GA733-2 a CEA, vzorek 2 je negativní a vzorek 3 je pozitivní na GA733-2, CEA a EGFR. Aktin je detekován ve vzorcích 1 až 4. PCR negativní (C-) a pozitivní kontrola (C+) jsou v posledních dvou pruzích.

Řešení problémů

Další informace, viz internetová stránka často kladených otázek v našem centru technické podpory: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vědci z technické podpory QIAGEN vždy rádi zodpoví Vaše otázky ohledně údajů a/nebo protokolů v tomto manuálu i obecně k technologiím pro přípravu vzorků a jejich rozboru (možnosti navázání kontaktu viz zadní strana nebo navštivte www.qiagen.com).

Kontrola kvality

V souladu se systémem řízení jakosti společnosti QIAGEN certifikovaným podle norem ISO byla každá šarže sady AdnaTest ColonCancerSelect a AdnaTest ColonCancerDetect testována podle předem stanovených kritérií, aby byla zaručena jednotná kvalita produktu.

Omezení

Všechny reagensy se smí používat výhradně pro diagnostiku in vitro.

Produkt by měli používat pouze pracovníci, kteří jsou speciálně poučeni a vyškoleni v metodice diagnostiky in vitro.

Je důležité, aby si obsluha před použitím systému důkladně přečetla pokyny k použití.

Přesné dodržování pokynů k použití je bezpodmínečně nutné k dosažení optimálních výsledků PCR.

Zkontrolujte data expirace vytištěná na obalu a štítcích všech součástí. Nepoužívejte součásti po jejich datu expirace.

Jakékoliv získané diagnostické výsledky se musí interpretovat v kontextu ostatních klinických nebo laboratorních nálezů.

Charakteristika účinnosti

Záchyt

Dvě a 10 nádorových buněk tlustého střeva T84 z kultivace byly přidány do krevních vzorků od zdravých dárců krve s cílem zjistit míry záchytu testu AdnaTest ColonCancerSelect/Detect (tabulka 5).

Tabulka 5. Míra záchytu testu AdnaTest ColonCancer nádorových buněk přidanych do krevních vzorků od zdravých dárců krve

	Celkový počet vzorků	Počet pozitivních	Záchyt
Dvě nádorové buňky přidány do 5 ml krve	63	48	76%
Deset nádorových buněk přidanych do 5 ml krve	41	41	100%

Při detekci 2 nádorových buněk přidanych do 5 ml krve od zdravých dárců je míra záchytu 76 %. Při detekci 10 nádorových buněk přidanych do 5 ml krve od zdravých dárců je míra záchytu 100 %.

Specifická

Testem AdnaTest ColonCancerSelect/Detect bylo analyzováno 106 zdravých dárců s cílem stanovit míru falešně pozitivních výsledků při dané hraniční hodnotě (zahrnutá koncentrace fragmentů 0,15 ng/μl pro každý testovaný gen kromě aktinu).

Tabulka 6. Stanovení specifické

Kontroly	Celkový počet vzorků	Počet falešně pozitivních	Specifická (%)
Zdraví dárce	106	2 (2%)	98

Test AdnaTest ColonCancerSelect/Detect vykázal specificku 98 % (tabulka 6).

Reprodukovatelnost

Do každého ze dvaceti vzorků krve od zdravých dárců bylo přidáno 10 nádorových buněk tlustého střeva T84. Reprodukovatelnost testu AdnaTest ColonCancerSelect/Detect byla stanovena pomocí analýzy vzorků krve dvěma obsluhami. Reprodukovatelnost v rámci testu i mezi testy byla 100 % (tabulka 7).

Tabulka 7. Reprodukovatelnost testu AdnaTest ColonCancer Select/Detect

Obsluha	Pozitivní výsledky/vzorky testu AdnaTest	Reprodukovatelnost v rámci testu (%)	Reprodukovatelnost mezi testy (%)
A	10/10	100	100
B	10/10	100	100

Přesnost

Přesnost byla stanovena po smíchání alikvotních podílů cDNA a analyzování pomocí testu AdnaTest ColonCancerDetect. Dvě obsluhy analyzovaly 30 vzorků cDNA ve třech nezávislých měřeních po 10 vzorcích. Přesnost v rámci testu i mezi testy byla 100 % (tabulka 8).

Tabulka 8. Přesnost testu AdnaTest ColonCancerDetect

Obsluha	Pozitivní výsledky/vzorky testu AdnaTest	Přesnost v rámci testu (%)	Přesnost mezi testy (%)
A	30/30	100	100
B	30/30	100	100

Interferující látky

Antikoagulancia

Při odběru a přepravě krve je nutné používat antikoagulancia. Nicméně použití heparinu a citrátu způsobuje po přidání imunomagnetických kuliček AdnaTest agregaci, což může zabránit získání výsledků testu nebo přinést nesprávné výsledky. EDTA a ACDA (citrát/dextróza/roztok adeninu A) jsou však kompatibilní s imunomagnetickými kuličkami AdnaTest.

Hemolýza

K hemolýze vzorků krve (frakce plazmy se jeví červená) dochází ve většině případů vinou nesprávné přepravy nebo nesprávných skladovacích podmínek. Tyto vzorky mohou dávat falešné negativní výsledky a je nutné je zlikvidovat.

Chemoterapeutika, přípravky pro cílenou léčbu a antihormonální režimy léčby

Chemoterapeutika (taxany, cisplatina, oxaliplatina, 5 fluorouracil, antracyklin, irinotecan, atd.) jsou silné cytotoxiny a způsobují poškození nebo rychlý zánik buněk ve vzorku krve. Toto přináší při použití imunomagnetických kuliček AdnaTest vysokou pravděpodobnost falešně negativních výsledků. Po podání těchto látek potřebuje lidské tělo asi 5–7 dní na detoxikaci (tabulka 9). Vzorky krve odebrané během tohoto období se nesmí používat v testu s imunomagnetickými kuličkami AdnaTest.

Tabulka 9. Poločasy chemoterapeutik

Přípravek	Poločas	Literatura
5-Fluorouracil	Až 20 minut	www.drugs.com/pro/fluorouracil-injection.html
Docetaxel	Až 11,1 hodin	www.drugs.com/pro/docetaxel.html
Cis-platinum	Až 30 minut	www.drugs.com/pro/cisplatin.html
Carbo-platinum	Až 5,9 hodin	www.drugs.com/pro/carboplatin.html
Paclitaxel	Asi 25,4 hodin	www.drugs.com/pro/paclitaxel.html

Stejná doporučení platí i pro režimy cílené léčby, když jsou protilátky (Herceptin[®], bevacizumab, cetuximab atd.), tyrozinkinázové blokátory (olaparib, Iressa[®], Erbitux[®], lapatinib atd.) a antihormonální léky (tamoxifen, abirateron, enzalutamid atd.) podávány jako jediné léčivo nebo v kombinaci s chemoterapeutiky.

V klinických hodnoceních prokazujících prognostickou hodnotu cirkulujících nádorových buněk (CTC), které byly identifikovány a charakterizovány pomocí imunomagnetických kuliček AdnaTest, nebyla zjištěna žádná negativní interference chemoterapeutik, cílených terapií nebo antihormonálních terapií za předpokladu, že byla dodržena čekací doba nejméně 7 dní po posledním podání léku. Navíc je nepravděpodobný negativní dopad běžných souběžně podávaných léků (Aspirin, ibuprofen, aprepitant, steroidy atd.), nicméně se sleduje.

Interferující podmínky

Srážení krve

Během klinických hodnocení jsme pozorovali srážení krve po inkubaci s imunomagnetickými kuličkami AdnaTest – nejčastěji u pacientů v pozdním stádiu onemocnění. Vzorky krve, které vykazují znaky srážení, se v testu AdnaTest obtížně zpracovávají kvůli zvýšené viskozitě a obtížím při pipetování. Obsahují i nepříjemně velké množství kontaminujících leukocytů, což vede k falešně pozitivním výsledkům. Takové vzorky je nutné zlikvidovat.

Benigní organická onemocnění a chronické zánětlivé stavy

Benigní organická onemocnění a chronické záněty, jako jsou artritida, benigní hyperplazie prostaty (BPH), Crohnova choroba atd., nevedou k falešně pozitivním výsledkům testu AdnaTest.

Akutní alergie

U akutních alergických stavů se po obohacení CTC pomocí imunomagnetických kuliček AdnaTest vyskytuje zvýšený počet kontaminujících leukocytů. Takže falešně pozitivní výsledky není možné plně vyloučit.

Klinické studie

Aby bylo možné srovnat zobrazovací data (získaná tři měsíce po zahájení léčby) s výsledky testu AdnaTest, byly analyzovány vzorky krve od 18 pacientů s metastatickou rakovinou tlustého střeva před zahájením léčby a během rané fáze léčby. Celková pozitivita CTC před zahájením léčby byla 67 % (12/18). Z těchto 12 pacientů 4 pacienti nereagovali na léčbu, u 2 pacientů bylo onemocnění stabilní a u 6 pacientů bylo dosaženo odpovědi (částečná remise). CTC přetrvaly u 75 % pacientů, kteří nereagovali na léčbu, ale zmizely během rané fáze léčby u 100 % pacientů ve skupině, která reagovala na léčbu. Tato zjištění ukazují, že analýza CTC u metastatické rakoviny tlustého střeva je časným indikátorem odpovědi na léčbu. (Lankiewicz et al. 2008).

Literatura

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.

Zkratky

AdnaMag-L	Koncentrátor magnetických částic (-velký)
AdnaMag-S	Koncentrátor magnetických částic (-malý)
bp	Páry bází
C+	Pozitivní kontrola
C-	Negativní kontrola
cDNA	Komplementární deoxyribonukleová kyselina
CEA	Karcinoembryonický antigen
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	Deoxynukleotidové trifosfáty
EGFR	Receptor epidermálního růstového faktoru
GA733-2	Antigen asociovaný s gastrointestinálním nádorem 733-2
kb	kilobáze
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
PCR	Polymerázová řetězová reakce
R-Náza	Ribonukleáza
ot/min	Otáčky za minutu
RT	Reverzní transkripce

Symboly



<N>



Obsahuje činidla pro <N> testů

Datum použitelnosti

Teplotní rozmezí

Katalogové číslo

Další informace viz návod k použití

Výrobce

Prostředek zdravotnické techniky pro diagnostiku in vitro

Číslo materiálu

Globální číslo obchodní položky

Informace pro objednání

Výrobek	Obsah	Kat. č.
AdnaTest ColonCancerSelect	Pro izolaci CTC a následnou extrakci mRNA z plné lidské krve pro 12 přípravků	395422
AdnaTest ColonCancerDetect	Souprava RT-PCR pro detekci genové exprese související s rakovinou tlustého střeva v obohacených nádorových buňkách	396422
Související produkty		
AdnaTube	12 zkumavek se vzorky obsahujících EDTA. Používejte pouze antikoagulovanou krev sesbíranou v A-CDA sběrných zkumavkách z BD.	399932
AdnaMag-L	Pro 8 zkumavek, 15 ml	399921
AdnaMag-S	Pro 8 zkumavek, 1,5 ml	399911
Sensiscript RT Kit (50)	Pro 50 reverzních transkripčních reakcí:* Sensiscript Reverse Transcriptase, 150 µl 10x Buffer RT, 100 µl dNTP Mix (obsahuje 5 mM z každé dNTP), 1,1 ml vody bez R-Názy	205211
HotStarTaq Master Mix Kit (250 U)	3 x 0,85 ml HotStarTaq Master Mix (obsahuje 250 jednotek HotStarTaq DNA polymerázy, PCR pufr s 3 mM MgCl ₂ , a 400 µM z každé dNTP) a 2 x 1,7 ml vody bez R-Názy	203443

* Souprava pro reverzní transkripci Sensiscript (kat. č. 50) postačí pouze pro 25 vzorků testovaných pomocí testu AdnaTest ColonCancerDetect, protože pro každou reakci je nutný dvojnásobný objem.

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro sadu QIAGEN nebo příručce uživatele. Příručky k soupravám QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na stránkách www.qiagen.com nebo si je lze vyžádat od technických služeb společnosti QIAGEN nebo místního distributora.

Smlouva o omezené licenci na AdnaTest ColonCancerSelect a AdnaTest ColonCancerDetect

Používáním tohoto produktu vyjadřuje kterýkoliv kupující nebo uživatel produktu svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento výrobek se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto výrobkem a touto příručkou a pro použití pouze s komponenty dodanými v soupravě. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění součástí, které jsou obsaženy v této soupravě, společně s kterýmikoliv součástmi, které nejsou v této soupravě obsaženy, s výjimkou případů popsanych v této příručce a dalších protokolech dostupných na stránkách www.qiagen.com. Některé z těchto doplňujících protokolů byly poskytnuty uživateli výrobků společnosti QIAGEN pro jiné uživatele výrobků QIAGEN. Tyto protokoly nebyly důkladně testovány ani optimalizovány společností QIAGEN. Společnost QIAGEN nezaručuje ani neposkytuje záruku na to, že neporušují práva třetích stran.
2. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou jinou záruku než výslovně stanovené licence v tom smyslu, že tato sada a/Nebo její použití nenarušuje práva třetích stran.
3. Tato sada a její komponenty jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přepracovávat ani opakovaně prodávat.
4. Společnost QIAGEN specificky odmítá jakékoliv další výslovné nebo nepřímé licence s výjimkou těch, které jsou uvedeny výslovně.
5. Kupující a uživatel této sady souhlasí s tím, že nepodnikne ani nikomu jinému neumožní podniknout žádné kroky, které by mohly vést k jakémukoli shora zakázané činnosti nebo ji usnadnit. Společnost QIAGEN může prosazovat základy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu, a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti se soupravou nebo jejími součástmi.

Aktualizovaná licenční ustanovení viz www.qiagen.com.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, HotStarTaq®, Sensiscript® (skupina QIAGEN); Agilent® (Agilent Technologies, Inc.); ERBITUX® (ImClone LLC., plně vlastněná pobočka společnosti Eli Lilly and Company); Herceptin® (Genentech, Inc.); IRESSA® (skupina AstraZeneca) LabChip® (Caliper Life Sciences, Inc.); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.); Vacutainer® (Becton Dickinson and Company).

HB-2343-001 © 2017 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná.

Objednávky www.qiagen.com/shop | Technická podpora support.qiagen.com | Webová stránka www.qiagen.com