



AdnaTest ColonCancerDetect

**RT-PCR-Nachweis von Darmkrebs assoziierter
Genexpression in angereicherten Tumorzellen**

Zur in-vitro Diagnose

Gebrauchsanweisung



Artikel-Nr. T-1-505 / T-1-513 / T-1-515

Inhaltsverzeichnis

Bestellinformation	3
Anwendungszweck	3
Abkürzungen und Symbole.....	4
Patente und eingetragene Markenzeichen.....	4
Produktbeschreibung.....	5
Kit-Bestandteile.....	6
Vom Anwender bereitzustellen	6
Lagerung.....	8
Besondere Anwendungshinweise.....	8
Protokoll	9
A Vorbereitung der Dynabeads Oligo(dT) ₂₅	9
B mRNA Isolierung.....	10
C Reverse Transkription.....	12
D Multiplex PCR	14
E Fragmentanalyse	15
Auswertung.....	17
Literatur	21
Fehleranalyse	21
Kurzanleitung	23

Bestellinformation

Informationen über unsere Produkte und die Adressen unserer Distributoren finden Sie auf unserer Webseite unter www.adnagen.com. Die Kits *AdnaTest ColonCancerSelect* und *ColonCancerDetect* können wie folgt bestellt werden:

	Spezifikation	Art. Nr.
<i>AdnaTest ColonCancerSelect</i>	12 Bestimmungen 24 Bestimmungen 36 Bestimmungen	T-1-504 T-1-512 T-1-514
<i>AdnaTest ColonCancerDetect</i>	12 Bestimmungen 24 Bestimmungen 36 Bestimmungen	T-1-505 T-1-513 T-1-515
<i>AdnaCollect</i>	12 Blutabnahmeröhrchen	T-1-600

Anwendungszweck



AdnaTest ColonCancerDetect ist ein in-vitro Diagnostikum und dient dem Nachweis einer Darmkrebs-assoziierten Genexpression in angereicherten Tumorzellen mittels RT-PCR.

AdnaTest ColonCancerSelect dient der Anreicherung zirkulierender Tumorzellen aus peripherem Blut.

Hinweis: Bei Patienten mit Colitis ulcerosa wurden vermehrt falsch positive Resultate beobachtet.

Weitere Informationen erhalten Sie unter www.adnagen.com

Abkürzungen und Symbole

bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C-	Negativkontrolle
C+	Positivkontrolle
CEA	Carcino-Embryonales Antigen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermis Wachstumsfaktor Rezeptor
GA733-2	Gastrointestinal Tumor-assoziiertes Antigen 733-2
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
	Verfallsdatum
	Lagerungstemperatur

Patente und eingetragene Markenzeichen

Eine Nutzung dieser Methode erfordert Lizenzen der Firma Hoffmann-La Roche AG, Basel. Der Kauf eines *AdnaTests* berechtigt den Nutzer nicht, die PCR ohne Lizenz zu nutzen.

Dynabeads ist ein eingetragenes Warenzeichen der Firma Dynal Biotech ASA, Oslo.

Die Warenzeichen *Sensiscript* und *HotStarTaq* wurden von der Firma Qiagen, Hilden, eingetragen.

LabChip ist ein eingetragenes Warenzeichen der Caliper Technologies Corp., Kalifornien.

Produktbeschreibung

AdnaTest ColonCancerDetect enthält Oligo (dT)₂₅-gekoppelte Magnetpartikel, mit denen mRNA aus Lysaten angereicherter Tumorzellen isoliert werden. Nach reverser Transkription dient die gewonnene cDNA als Ausgangsmaterial für eine Multiplex-PCR zum Nachweis der Tumorzellen. Mit Hilfe des *PrimerMix ColonDetect* werden drei Tumormarker und ein Kontroll-Gen amplifiziert. Die zu diesem Zweck verwendeten Primer erzeugen Fragmente folgender Größen:

GA733-2 : 383 bp
CEA : 226 bp
EGFR : 161 bp
Aktin : 114 bp (interne PCR-Kontrolle)

Kit-Bestandteile

AdnaTest ColonCancerDetect enthält die folgenden Komponenten (Anzahl der Gefäße):

Tabelle 1: Kit-Komponenten

Komponenten	Symbole	T-1-505 (12 Tests)	T-1-513 (24 Tests)	T-1-515 (36 Tests)
<i>Lysis/Binding Buffer</i>	3	1	1	1
<i>Dynabeads Oligo(dT)₂₅</i>	4	1	2	3
<i>Buffer A</i>	5	1	1	1
<i>Buffer B</i>	6	1	1	1
<i>10 mM Tris-HCl</i>	7	1	1	1
<i>PrimerMix ColonDetect</i>	8	1	2	3
<i>Positive Control (C+)</i>	9	1	2	3

Die Reagenzienmengen erlauben die Analyse von 6 Kontroll-PCR Ansätzen 12 Blutproben.

Vom Anwender bereitzustellen

Geräte:

- Überkopfmischer für 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Magnetpartikelkonzentrator MPC-S (DynaL MPC-S, Invitrogen, Prod.-Nr. 120-20D)
- Thermomixer oder Wasserbad (50 °C)

- Thermozykler mit heizbarem Deckel und einer Heizrate von 2 °C/s
- Agarosegel-Elektrophorese- und Bilddokumentationssystem oder ein alternatives Analysesystem wie z.B. Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies)

Verbrauchsmittel:

- Sterile, RNase-freie dünnwandige 0,2 ml PCR-Gefäße
- Sterile, RNase-freie 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Pipetten (1,0 - 200,0 µl)
- RNase-freie Pipettenspitzen mit Filter als Aerosolbarriere
- Schutzhandschuhe
- Agarosegele, z.B. Fertig-Agarosegele 4 %, mit Ethidiumbromid (SIGMA, Kat.-Nr. P 6097)

Reagenzien:

- *Sensiscript* RT Kit (Qiagen, z. B. Kat.-Nr. 205211 für 50 Reaktionen)
Achtung: Der *Sensiscript* RT Kit (Kat.-Nr. 205211) kann nur für 25 Reaktionen verwendet werden, da pro Ansatz das doppelte Volumen eingesetzt wird.
- Rekombinantes RNAsin, RNase-Inhibitor, 2500 U (Promega, Kat.-Nr. N2511)
- *HotStarTaq Master Mix* Kit (Qiagen, z. B. Kat.-Nr. 203443, 250 Units)

Lagerung

Der *AdnaTest ColonCancerDetect* wird bei 4 °C gelagert und darf nur bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

Entnehmen Sie *PrimerMix ColonDetect* [8] und *Positive Control* [9] (C+) und lagern Sie diese separat bei -20 °C.

Um Verunreinigungen und häufige Temperaturwechsel zu vermeiden, sollte der *PrimerMix ColonDetect* [8] aliquotiert werden.

Besondere Anwendungshinweise

- Der *AdnaTest* darf nur von molekularbiologisch geschultem Personal durchgeführt werden.
- Die von anderen Herstellern stammenden Komponenten und Reagenzien sind gemäß der jeweiligen Produktbeschreibung zu lagern. Beachten Sie die Anwendungs- und Warnhinweise der Hersteller.
- Zur Vermeidung von Kontaminationen durch DNA, RNA oder RNase sind Schutzhandschuhe zu tragen.
- Die Probenbearbeitung muss in der vorgegebenen Reihenfolge durchgeführt werden. Dabei sind u. a. Reihenfolgen, Zeiten und Inkubationstemperaturen einzuhalten.
- Die RNA-Isolierung und die Herstellung der Reaktionsansätze sollten räumlich getrennt von der PCR erfolgen.

- Die Verwendung von Produkten anderer Hersteller als angegeben wird zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Sicherheit- und Hygienebestimmungen des Laborbetriebes sind einzuhalten (z. B. das Tragen von Laborkittel, Schutzbrille, Schutzhandschuhen).

Protokoll

Die Abschnitte A bis C beschreiben die mRNA-Isolierung und die Reverse Transkription.

A Vorbereitung der Dynabeads Oligo(dT)₂₅

1. *Lysis/Binding Buffer* [3] auf Raumtemperatur erwärmen.
Hinweis: Falls sich während der Lagerung des *Lysis/Binding Buffers* Präzipitate gebildet haben, bringen Sie diese durch Schütteln des auf Raumtemperatur erwärmten Puffers vollständig in Lösung.
2. *Dynabeads Oligo(dT)₂₅* [4] mit einer Pipette sorgfältig resuspendieren; nicht vortexen!
3. Benötigtes Volumen an Dynabeads entsprechend der Probenzahl berechnen (20 µl / Probe zuzüglich 10 %) und in ein RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen.
4. Reaktionsgefäß in den MPC-S stellen.
Hinweis: Der MPC-S erlaubt zwei Positionen des Magneten. Um eine effiziente Abtrennung der Dynabeads sicherzustellen, muss der Magnet immer vorne, nahe am Reaktionsgefäß, eingesetzt werden.
5. Nach 1 min Überstand mit einer Pipette abnehmen und verwerfen.
6. Waschen:
 - a. Magnet aus dem MPC-S entfernen.

- b. Dynabeads in *Lysis/Binding Buffer* [3] auf das vorherige Volumen (s. Schritt 3) einstellen. Vorsichtig resuspendieren, um Schaumbildung zu vermeiden.
- c. Magnet in den MPC-S einsetzen.
- d. Nach 1 min den Überstand mit einer Pipette abnehmen.
Waschvorgang 1x wiederholen (2x Waschen insgesamt).

7. Reaktionsgefäß aus dem MPC-S herausnehmen und die Dynabeads durch Resuspendieren in *Lysis/Binding Buffer* [3] auf das entsprechende Volumen (20 µl / Probe zuzüglich 10 %, wie in Schritt 3) einstellen.

B mRNA Isolierung

Vorbereitung

- I. Waschpuffer *Buffer A* [5] and Waschpuffer *Buffer B* [6] auf Raumtemperatur erwärmen.
- II. 10 mM *Tris-HCl* [7] auf Eis halten.
- III. RNase-freies Wasser (aus Sensiscript RT Kit, Qiagen) auftauen.
- IV. Thermomixer oder Wasserbad auf 50 °C vorwärmen.

Durchführung

1. 20 µl Dynabeads Oligo(dT)₂₅ (aus Schritt A7) gut resuspendiert entnehmen und dem Zellysat (aus Schritt B16 der AdnaTest ColonCancerSelect (Gebrauchsanweisung) zusetzen.
2. Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur in einem Überkopfmischer (ca. 20 rpm).
3. Reaktionsgefäß in den MPC-S stellen.
4. Nach 1 min den Überstand abnehmen und verwerfen.

5. Waschschritt A:
 - a. Magnet aus dem MPC-S entfernen.
 - b. 100 µl Waschpuffer *Buffer A* **5** zugeben und die Dynabeads mit einer Pipette resuspendieren .
 - c. Magnet in den MPC-S einsetzen
 - d. Den Überstand nach 1 min komplett abnehmen und verwerfen. Waschvorgang 1x wiederholen (2x Waschen insgesamt).
6. Waschschritt B:
 - a. Magnet aus dem MPC-S entfernen.
 - b. 100 µl Waschpuffer *Buffer B* **6** zugeben, die Dynabeads mit einer Pipette resuspendieren und in ein neues Reaktionsgefäß überführen.
 - c. Magnet in den MPC-S einsetzen.
 - d. Den Überstand nach 1 min komplett abnehmen und verwerfen. Waschvorgang 1x wiederholen, ohne das Reaktionsgefäß zu wechseln (2x Waschen insgesamt).
7. Magnet aus dem MPC-S entfernen.
8. 100 µl eiskaltes 10 mM *Tris-HCl* **7** zugeben und Dynabeads mit einer Pipette resuspendieren
9. Magnet in den MPC-S einsetzen.
10. Nach 1 min Überstand komplett abnehmen.
11. Magnet aus dem MPC-S entfernen.
12. Resuspendieren des mRNA/Dynabeads-Komplexes in 29,5 µl RNase-freiem Wasser.
13. Reaktionsgefäße in einen Thermomixer oder Wasserbad für 5 min bei 50 °C unter Schütteln (ca. 650 rpm) inkubieren.

14. Reaktionsgefäße umgehend für mindestens 2 min auf Eis stellen.
15. Die Durchführung der reversen Transkription muss direkt im Anschluss erfolgen (max. 5 min; Abschnitt C).

Eine Lagerung des mRNA/Dynabeads-Komplexes ist nicht möglich!

C Reverse Transkription

(Sensiscript Reverse Transcriptase Kit, Qiagen)

1. 10x Buffer RT und dNTPs bei Raumtemperatur auftauen, vortexen, kurz zentrifugieren, um Tropfen aus dem Deckel zu lösen, und auf Eis halten.
2. Die Herstellung des RT Master Mix erfolgt gemäß Tabelle 2. Halten Sie den Master Mix auf Eis.
Das Volumen des RT Master Mix sollte 10 % größer sein als der aus der Probenzahl errechnete Bedarf. Das Mitführen einer Negativkontrolle ohne Zugabe von mRNA wird empfohlen (RT-Kontrolle).
3. Den RT Master Mix gründlich vortexen, kurz zentrifugieren und 10,5 µl pro Ansatz in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß vorlegen.
4. Den mRNA/Dynabeads-Komplex (aus Schritt B14) vorsichtig mit einer Pipette resuspendieren und das gesamte Volumen von 29,5 µl in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß mit vorgelegtem RT Master Mix geben. Sorgfältig mischen und kurz zentrifugieren. Für die RT-Kontrolle 29,5 µl RNase-freies Wasser statt mRNA zugeben.

Tabelle 2: Reverse Transkription

Komponenten			Volumen
RT Master Mix	<i>Sensiscript</i> RT Kit (Qiagen)	10x Buffer RT	4,0 µl
		dNTPs	4,0 µl
		<i>Sensiscript</i> Reverse Transcription (SRT)	2,0 µl
	RNase Inhibitor, 40 U/µl (Promega)	0,5 µl	
Probe	mRNA/Dynabeads-Komplex oder RNase-freies Wasser (RT-Kontrolle)		29,5 µl
	Gesamtvolumen		

5. Die cDNA-Synthese erfolgt im Thermozykler unter folgenden Bedingungen (Tabelle 3).

Tabelle 3 RT Programm

37 °C	→	60 min
93 °C	→	5 min
4 °C	→	∞

6. Nach Beendigung des Programms die Reaktionsgefäße umgehend auf Eis stellen oder bei -20 °C nicht länger als 14 Tage lagern.

D Multiplex PCR

- HotStarTaq Master Mix (Qiagen), destilliertes H₂O, PrimerMix ColonDetect [8] und Positivkontrolle (C+) [9] auftauen, vortexen, kurz zentrifugieren und auf Eis stellen.
- Das Herstellen des PCR Master Mix erfolgt gemäß Tabelle 4. Das Volumen des PCR Master Mix sollte 10 % größer sein als der aus der Probenzahl errechnete Bedarf. Es müssen stets eine Positivkontrolle (C+) [9], eine Negativkontrolle (Wasser/C-) und die RT Kontrolle mitgeführt werden.
- Pro Reaktionsansatz werden 42 µl des PCR Master Mix in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt.
- Den cDNA/Dynabeads-Komplex durch Pipettieren gründlich mischen und dazu geben (Schritt C6).
- Hinweis:** Als Negativkontrolle Wasser/C- 8 µl destilliertes H₂O statt cDNA zugeben.

Tabelle 4: Vorbereitung der multiplex PCR

Komponenten			Volumen
PCR Master Mix	aus dem <i>HotStarTaq Master Mix</i> Kit (Qiagen)	<i>HotStarTaq Master Mix</i>	25,0 µl
		Destilliertes Wasser	13,0 µl
		<i>PrimerMix ColonDetect</i> [8]	4,0 µl
Probe	cDNA oder RT-Kontrolle oder Negativkontrolle (Wasser/C-) oder Positivkontrolle (C+) [9] jeweils:		8,0 µl
Gesamtvolumen			50,0 µl

Die PCR erfolgt in einem Thermozykler mit einer Heizrate von 2 °C / Sekunde nach folgendem Programm (Tabelle 5).

Tabelle 5: PCR-Programm

95 °C	15 min	} 38 Zyklen
94 °C	45 s	
58 °C	45 s	
72 °C	45 s	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

E Fragmentanalyse

Empfohlen wird, die PCR-Produkte mit dem Bioanalyser Agilent 2100 und dem DNA 1000 LabChip (Agilent Technologies) zu analysieren. Befolgen Sie die Gebrauchsanweisung des DNA 1000 LabChip.

Es muss sichergestellt sein, dass keine Magnetpartikel in den Chip gelangen. Im Gel befindliche Magnetpartikel können fehlerhafte Ergebnisse erzeugen. Bei Benutzung des Agilent Bioanalyser 2100 muss laut folgender Beschreibung ein Grenzwert eingestellt werden:

Beim Start der Bioanalyser Software Bio Sizing wird ein Default Assay angelegt. Im Hauptmenü unter Assay wird dsDNA > DNA 1000 aufgerufen. Ebenfalls unter Assay > DNA 1000 > properties kann Global „Peak Find“ aufgerufen werden. In der Einstellung Min Peak Height wird der Wert auf 0 gesetzt. Diese Voreinstellung wird unter 'AdnaGen ColonCancerDetect' gespeichert und für sämtliche Analysen verwendet, die mit dem *ColonCancerDetect* Kit durchgeführt werden.

Alternativ werden die PCR-Produkte unter Verwendung eines 4 % Agarosegels analysiert. Dafür werden 10 µl PCR-Produkt aufgetrennt. Zusätzlich wird die Verwendung eines DNA Standards (100 bp Fragmentleiter) gemäß der Angabe des Herstellers als Größenstandard empfohlen. Um eine deutliche Unterscheidung der zu erwartenden Fragmente zu gewährleisten, muss die Trennstrecke mindestens 5 cm betragen. Bedingungen für die Elektrophorese: 100 Volt, ≥ 1 h.

Auswertung

Das Testergebnis wird positiv gewertet, wenn das PCR-Fragment mindestens eines Tumormarkers eindeutig nachweisbar ist.

Bei Benutzung des Bioanalyser Agilent 2100 sind sämtliche Peaks mit einer Konzentration von $\geq 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ als positiv zu bewerten (Abbildung 1). Peaks, deren Konzentration $< 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ sind negativ zu bewerten.

Zusätzlich müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

- Das Fragment des Kontroll-Gens Aktin muss in allen Patientenproben und in der Positivkontrolle vorhanden sein (interne PCR-Kontrolle). Es stellt eine Positivkontrolle für drei Vorgänge dar:
 - a. Zellisolierung war erfolgreich.
 - b. Reverse Transkription und anschließende
 - c. Multiplex-PCR waren erfolgreich.
- In der Negativkontrolle (Wasser / C-) und der RT-Kontrolle dürfen keine Banden sichtbar sein, die größer sind als 80 bp (Primerdimere).
- Die Detektion eines Fragmentes, das größer ist als 1 kb, deutet auf eine Kontamination mit genomischer DNA hin. Der Separationsprozess war somit nicht erfolgreich und die Ergebnisse müssen verworfen werden.

Wenn Sie Hilfe bei der Interpretation von Ergebnissen benötigen, wenden Sie sich bitte an unser Support-Team.

Hinweis: Der *AdnaTest ColonCancerSelect* und *AdnaTest ColonCancerDetect* sind dahingehend optimiert, eine geringe Expression Tumor-assoziiertes mRNA-Marker auszuschließen. Jede Veränderung des Protokolls oder in der Benutzung des hoch sensitiven Bioanalyser Agilent 2100 kann vereinzelt zur Detektion schwach exprimierter tumor-assoziiertes mRNA-Marker in Zellen gesunder Probanden führen.

Jede Abweichung vom Protokoll kann zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen führen.

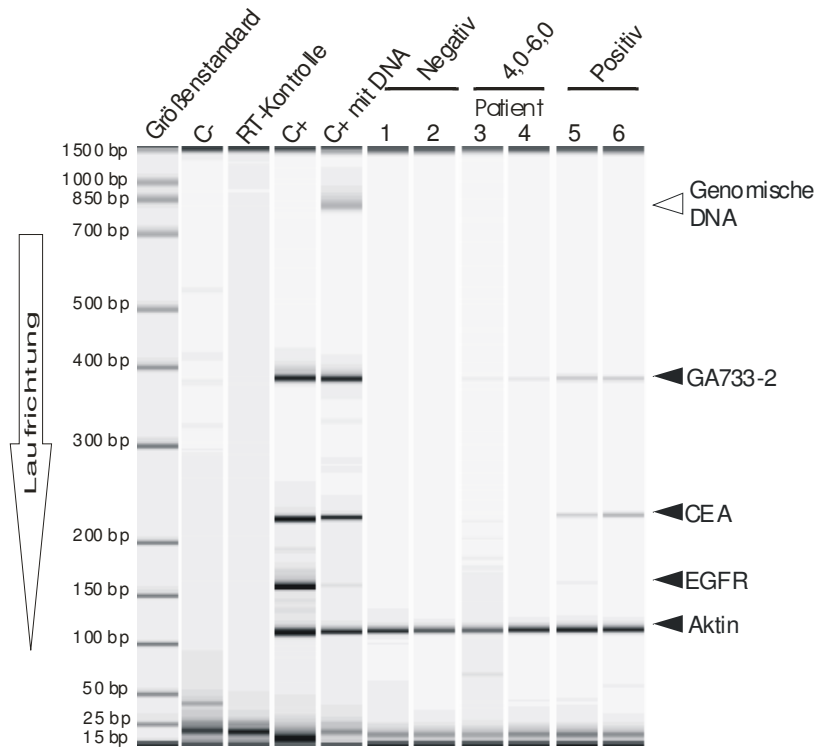


Abbildung 1: AdnaTest ColonCancerDetect an Patientenproben.

Fragmentanalyse mit dem Bioanalyzer 2100: DNA-Größenstandard, PCR-Kontrolle (C-), RT-Kontrolle (RT-control), Positivkontrolle (C+) und cDNA einer Zelllinie, kontaminiert mit einer geringen Menge genomischer DNA. Patienten 1 und 2 waren negativ, Patienten 5 und 6 waren positiv für mindestens einen der drei Tumor-assoziierten Marker GA733-2, CEA und EGFR. Daten zu Patienten 3 und 4 waren nicht auswertbar, da die Peakhöhen von 4,0 und 6,0 liegen.

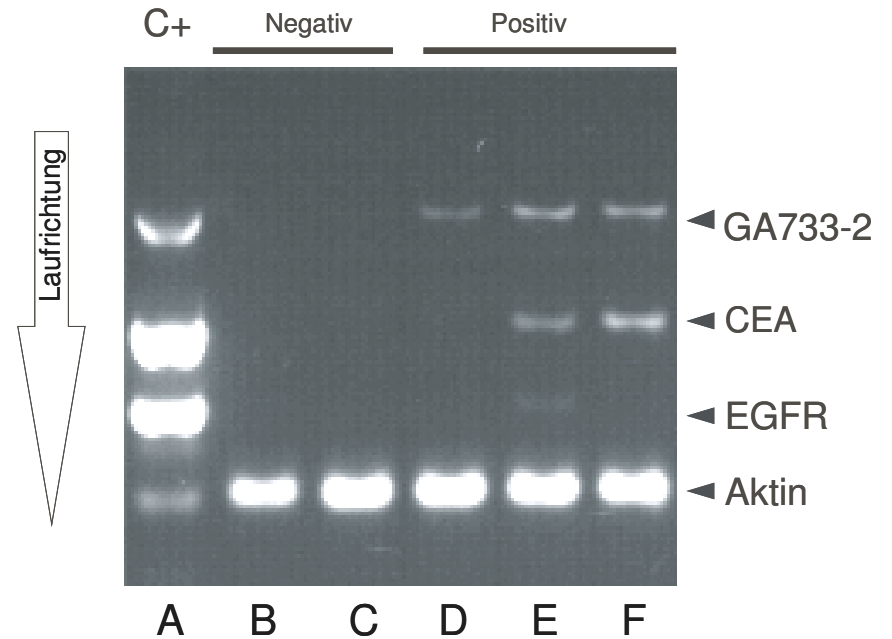


Abbildung 2: Analyse durch Gel-Elektrophorese.

In dem gezeigten 4 % Agarosegel sind negative und positive Patientenproben dargestellt. Probe A ist die Positivkontrolle. Proben B + C sind negativ. Proben D, E und F sind positiv zu bewerten.

Literatur

Literaturhinweise finden Sie auf unserer Web-Seite.

<http://www.adnagen.com>

Fehleranalyse

Grundsätzlich gilt, dass sämtliche Arbeitsschritte entsprechend der Angaben im Handbuch durchgeführt werden müssen. Sollten dennoch Probleme auftreten, so finden Sie in der folgenden Tabelle 6 Hinweise auf mögliche Ursachen und Anregungen zur Fehlerbehebung. Da Fehler schon bei der Anreicherung von Zellen stattfinden können, wird in der Tabelle auch auf den AdnaTest ColonCancerSelect Kit verwiesen.

Führen diese Hinweise nicht zur Beseitigung des Problems, so wenden Sie sich bitte an unser Support-Team.

Tabelle 6 Fehleranalyse

Problem	Mögliche Ursachen	Möglichkeiten zur Problembeseitigung
Es treten keine Banden nach der Fragmentanalyse auf	Pipettierfehler	Wiederholung
	Probleme mit Reagenzien	Kontrolle der Reagenzien (Lagerung etc.).
	Kontamination mit RNase	Überprüfung RNase-freier Materialien (Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße) und Reagenzien. Unbedingt Handschuhe tragen und diese regelmäßig wechseln.

	Schlechte Qualität der Blutprobe	Überprüfung, ob die Blutabnahme mit empfohlenen Blutabnahmesystemen erfolgte. Überprüfung, ob nicht hämolyisiertes Blut untersucht wurde und die Blutabnahme vor Verabreichung von Medikamenten erfolgte. Wenn die Selektionsbeads während der Probenbearbeitung Klumpen bilden, muss die Probe verworfen werden. Die Blutprobe muss nach der Abnahme umgehend auf Eis und dann bei 4 °C gelagert werden. Die Blutprobe muss innerhalb von 4 h (EDTA) bzw. 24 h (<i>AdnaCollect</i>) nach Abnahme bearbeitet werden.
	Keine Identifizierung von Banden aufgrund von schlechter Auftrennung	Überprüfung von: Gelkonzentration, Puffern, Laufzeit und angelegter Spannung.
RT-Kontrolle und Negativkontrolle (C-) zeigen Fragmente größer als 80 bp	Kontamination	Austausch sämtlicher Reagenzien. Das Aliquotieren sämtlicher Reagenzien vor Benutzung wird empfohlen. Benutzung von Filterspitzen. Wenn möglich, mRNA-Isolierung und Herstellung der Reaktionsansätze räumlich von der Analyse der PCR-Produkte trennen.
Diffuse Banden im Agarosegel	Bedingungen für die Gel-Elektrophorese sind nicht optimal.	Überprüfung der Gelkonzentration und des pH-Wertes des Laufpuffers.
Auftreten von Banden größer als 1000 bp	Kontamination mit genomischer DNA	Wiederholung der Anreicherung von Tumorzellen und der RT-PCR.

Kurzanleitung

AdnaTest ColonCancerDetect

Komponenten	<i>Lysis/Binding Buffer</i>	3
	<i>Oligo(dT)₂₅ Beads</i>	4
	<i>Buffer A</i>	5
	<i>Buffer B</i>	6
	<i>Tris HCl</i>	7
	<i>PrimerMix ColonDetect</i>	8
	<i>Positive Control (C+)</i>	9

Sie benötigen 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße.
 1 x 1,5 ml Reaktionsgefäß pro Probe (RNase frei).
 1 - 200 µl Pipette und Pipettenspitzen (RNase frei).
 4 % Agarosegel.
 Sensiscript RT Kit (Qiagen).
 HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen).

- Lösungen **3**, **4**, **5** und **6** auf Raumtemperatur bringen und Lösung **7** auf Eis stellen.
- Je Probe 20 µl *Oligo(dT)₂₅ Beads* **4** (+10 %) mit 20 µl *Lysis/Binding Buffer* **3** pro Probe 2x waschen.
- Zugabe 20 µl gewaschener *Oligo(dT)₂₅ Beads* **4** zu jedem Zelllysats.
- Inkubation in einem Überkopfmischer (ca. 20 rpm) für 10 min bei Raumtemperatur.
- Reaktionsgefäß in MPC-S stellen und Überstand verwerfen.
- Beads mit 2x 100 µl *Buffer A* **5** waschen.
- Beads in 100 µl *Buffer B* **6** aufnehmen, in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen.

- Reaktionsgefäß in MPC-S stellen und Überstand verwerfen.
- Beads 1x mit 100 µl *Buffer B* **6** waschen.
- Beads mit 1x 100 µl *Tris-HCl* **7** waschen.
- Beads (mRNA Magnetpartikel-Komplex) in 29,5 µl RNase freies Wasser aufnehmen.
- Inkubation der Reaktionsgefäß für 5 min bei 50 °C.
- Anschließend umgehend für mind. 2 min auf Eis stellen.
- 10x Buffer RT und dNTP's auftauen und die reverse Transkription (RT) laut Tabelle 7 und Tabelle 8 durchführen.

Tabelle 7: Reverse Transkription

Komponenten			Volumen
RT Mastermix	<i>Sensiscript</i> RT Kit (Qiagen)	10x Buffer RT	4,0 µl
		dNTPs	4,0 µl
		<i>Sensiscript</i> Reverse Transcriptase (SRT)	2,0 µl
		RNase Inhibitor, 40 U/µl (Promega)	0,5 µl
Probe	mRNA-Bead-Komplex oder RNase-freies Wasser (als RT-Kontrolle)		29,5 µl
Gesamtvolumen			40,0 µl

Tabelle 8: RT-Programm

37 °C	→	60 min
93 °C	→	5 min
4 °C	→	∞

- Reaktionsgefäße umgehend auf Eis stellen oder bei -20 °C für max. 14 Tage lagern.
- Multiplex PCR entsprechend Tabelle 9 und Tabelle 10 durchführen.

- *HotStarTaq* auftauen und PCR Master Mix laut Tabelle 9 vorbereiten.

Tabelle 9 Multiplex-PCR

Komponenten			Volumen
PCR Master Mix	aus dem <i>HotStarTaq Master Mix</i> Kit (Qiagen)	<i>HotStarTaq Master Mix</i>	25,0 µl
		Destilliertes Wasser	13,0 µl
	<i>PrimerMix ColonDetect</i> [8]		4,0 µl
Probe	cDNA oder RT-Kontrolle oder Negativkontrolle (Wasser/C-) oder Positivkontrolle (C+) [9] jeweils:		8,0 µl
Gesamtvolumen			50,0 µl

Tabelle 10 PCR-Programm

95 °C	15 min	} 38 Zyklen
94 °C	45 s	
58 °C	45 s	
72 °C	45 s	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

- Für die Fragmentanalyse tragen Sie die RT-Kontrolle, PCR Positiv- und Negativkontrollen auf den Bioanalyzer 2100 (Agilent) auf. Alternativ ist eine Analyse mit einem 4 %igen Agarosegel (100 V für ca. 60 min) möglich.
- Auswertung siehe Gebrauchsanweisung.

AdnaGen AG
Ostpassage 7
30853 Langenhagen
Deutschland

Tel. ++49 (0) 511 72 59 50 - 50

Fax ++49 (0) 511 72 59 50 - 40

E-Mail support@adnagen.com