



# *AdnaTest BreastCancerSelect*

**Anreicherung von Tumorzellen aus dem Blut von  
Brustkrebspatientinnen zur Genexpressionsanalyse.**

*Zur in-vitro Diagnose*

## **Gebrauchsanweisung**



Artikel-Nr. 81005 / 81021 / 81024

### **Inhaltsverzeichnis**

Bestellinformation .....	3
Anwendungszweck .....	3
Abkürzungen und Symbole.....	4
Patente und eingetragene Markenzeichen.....	4
Produktbeschreibung.....	5
Kit-Bestandteile.....	6
Vom Anwender bereitzustellen .....	6
Lagerung.....	7
Besondere Anwendungshinweise.....	7
Protokoll .....	9
A    Vorbereitung der BreastSelect Beads .....	9
B    Selektion von Tumorzellen .....	10
Literatur .....	12
Kurzanleitung .....	13

## Bestellinformation

Die von der AdnaGen entwickelten Kits *AdnaTest BreastCancerSelect* und *AdnaTest BreastCancerDetect* werden von der AdnaGen AG produziert. Die Distribution, Verkauf und das Marketing übernimmt die Firma Innogenetics NV.

	Spezifikation	Art. Nr.
<i>AdnaTest BreastCancerSelect</i>	12 Bestimmungen	81005
	24 Bestimmungen	81021
	36 Bestimmungen	81024
<i>AdnaTest BreastCancerDetect</i>	12 Bestimmungen	81004
	24 Bestimmungen	81019
	36 Bestimmungen	81022
<i>AdnaCollect</i>	12 Blutabnahmeröhrchen	81003



## Anwendungszweck

Der *AdnaTest BreastCancerSelect* ist ein in-vitro Diagnostikum und dient der Anreicherung von Tumorzellen aus dem Blut von Brustkrebspatientinnen.

Mit dem *AdnaTest BreastCancerDetect* werden die angereicherten Zellen auf die tumorassoziierte Expression von mRNA untersucht.

Weitere Information erhalten Sie unter [www.adnagen.com](http://www.adnagen.com).

## Abkürzungen und Symbole

bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
MPC (-S, -L)	Magnetpartikelkonzentrator ( <i>small, large</i> )
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RT	Reverse Transkription
	Haltbarkeitsdatum
	Lagerungstemperatur

## Patente und eingetragene Markenzeichen

*Dynabeads* ist ein eingetragenes Markenzeichen der Firma Dynal Biotech ASA, Oslo, Norwegen.

## Produktbeschreibung

Der *AdnaTest BreastCancerSelect* ermöglicht die immunomagnetische Anreicherung von Tumorzellen über epitheliale und tumorassoziierte Antigene.

Antikörper, die an Magnetpartikel (Dynabeads) gekoppelt sind, binden an epitheliale und tumorassoziierte Antigene der Tumorzellen. Anschließend werden die so markierten Zellen im Magnetfeld isoliert (Abbildung 1).

Das Lysat der angereicherten Zellen wird für weitere Analysen verwendet (siehe auch *AdnaTest BreastCancerDetect*).

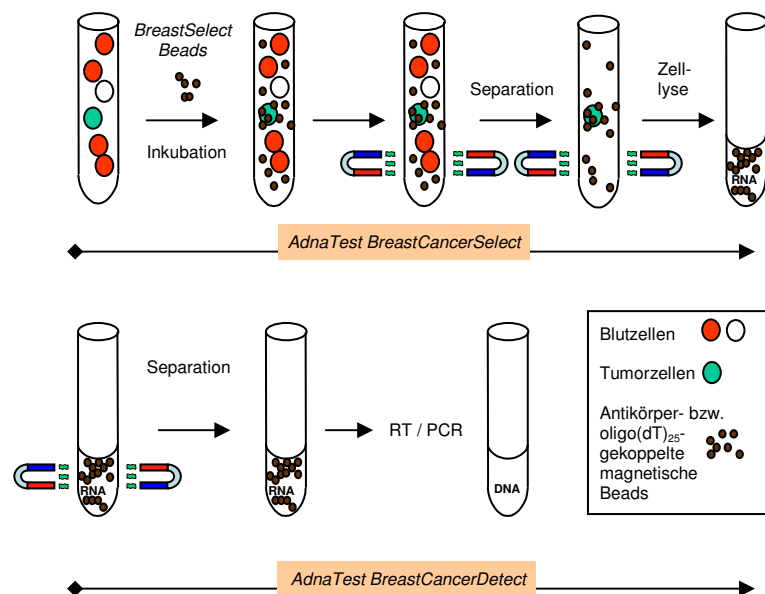


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung.

## Kit-Bestandteile

Der *AdnaTest BreastCancerSelect* enthält die folgenden Komponenten (Anzahl der Gefäße):

Tabelle 1: Kit-Bestandteile

Komponente	Symbol	81005 (12 Best.)	81021 (24 Best.)	81024 (36 Best.)
<i>BreastSelect Beads</i>	1	1	2	3
<i>Lysis/Binding Buffer</i>	2	1	1	1

## Vom Anwender bereitzustellen

Geräte:

- Überkopfmischer
- Magnetpartikelkonzentrator MPC-L (DynaL MPC-L, Invitrogen, Prod.-Nr. 120-21D) und MPC-S (DynaL MPC-S, Invitrogen, Prod.-Nr. 120-20D)

Verbrauchsmittel:

- Sterile, RNase-freie Glas- oder Plastikpipetten (10 ml) und Pipettierhilfe
- Sterile, RNase-freie 1,5 ml Reaktionsgefäße
- 15 ml Zentrifugenröhrchen (es werden sterile, RNase-freie Polypropylen-Röhrchen empfohlen)
- Pipetten (100 - 1000 µl), RNase-freie Pipettenspitzen mit Filter als Aerosolbarriere
- Schutzhandschuhe, Schutzbrille

Reagenzien:

- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,2 (Invitrogen, Kat.-Nr. 14190-094, D-PBS)

## Lagerung

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

## Besondere Anwendungshinweise

Der Test darf nur von Fachpersonal durchgeführt werden, das molekularbiologische Techniken beherrscht.

### Probennahme

- Die Blutprobe muss entnommen werden bevor Chemotherapeutika appliziert werden.
- Seit der letzten Verabreichung von Chemotherapeutika müssen mindestens 5 Tage vergangen sein.
- Die Blutentnahme (mindestens 5 ml) muss mit **AdnaCollect**-Blutabnahmesystemen (Art. Nr. T-1-600, AdnaGen) erfolgen oder mit **EDTA**-enthaltenden Abnahmesystemen ('S-Monovette<sup>®</sup> Kalium EDTA', Sarstedt; 'BD Vacutainer<sup>®</sup> K<sub>3</sub>EDTA', Becton Dickinson).
- Das entnommene Blut sofort auf Eis stellen und bei 4 °C aufbewahren.
- **Die Bearbeitung der Blutproben muss spätestens 24 h (AdnaCollect) bzw. 4 h (handelsübliche EDTA-haltige Abnahmesysteme) nach der Entnahme erfolgen.**
- Es muss sichergestellt werden, dass das Blut nicht hämolysiert wird.

## Handhabung

- Die *BreastSelect Beads* 1 enthalten Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) als Bakterizid. NaN<sub>3</sub> ist zytotoxisch und muss daher vor der Verwendung der Beads entfernt werden.
- Alle Kitkomponenten und weitere zugekaufte Reagenzien sind laut Herstellerangaben zu lagern. Es gelten die Sicherheitshinweise des jeweiligen Herstellers.
- Zur Vermeidung von DNA-, RNA- und RNase-Kontaminationen sind Schutzhandschuhe zu tragen.
- Wir empfehlen, die *BreastSelect Beads* zu aliquotieren, um Kontaminationen zu vermeiden.
- Alle Arbeitsschritte müssen entsprechend des Protokolls durchgeführt werden. Dabei sind u. a. Reihenfolgen, Zeiten und Inkubationstemperaturen einzuhalten.
- Proben müssen verworfen werden, wenn die *BreastSelect Beads* während der Zellanreicherung Klumpen bilden.
- Es wird dringend empfohlen, die Probenbearbeitung und das Ansetzen der Reaktionsansätze räumlich getrennt von der Analyse der PCR-Produkte durchzuführen.
- Die Hygiene- und Sicherheitsvorschriften des Laborbetriebes sind einzuhalten (z. B.: das Tragen von Laborkittel, Schutzbrille, Schutzhandschuhen).

## Protokoll

### A Vorbereitung der BreastSelect Beads

Die *BreastSelect Beads* müssen kurz vor der Verwendung gewaschen werden, um das  $\text{NaN}_3$  zu entfernen:

1. *BreastSelect Beads* **1** mit einer Pipette sorgfältig resuspendieren; nicht vortexen!
2. Entsprechend der Probenzahl jeweils 100  $\mu\text{l}$  entnehmen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen. Bei mehr als 10 Proben ein weiteres 1,5 ml Reaktionsgefäße benutzen.
3. Reaktionsgefäß in den MPC-S stellen.
4. Nach 1 min den Überstand mit einer Pipette vorsichtig abnehmen und verwerfen.

#### Wichtig während der gesamten Durchführung:

**Beim Abnehmen des Überstandes die *BreastSelect Beads* nicht berühren!**

5. Waschschrirte:
  - a. Magneten aus dem MPC-S herausnehmen.
  - b. 1 ml PBS zugeben; *BreastSelect Beads* durch mehrmaliges Pipettieren resuspendieren.
  - c. Magneten in den MPC-S einsetzen.
  - d. Nach 1 min den Überstand mit einer Pipette vollständig abnehmen und verwerfen.Waschschritt zweimal wiederholen (insgesamt 3 Waschschrirte).
6. Das Reaktionsgefäß aus dem MPC-S nehmen. Die Beads in dem ursprünglichen Volumen PBS (100  $\mu\text{l}$  je Probe) sorgfältig mit einer Pipette resuspendieren und auf Eis lagern.

### B Selektion von Tumorzellen

1. 5 ml Blut in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführen.  
(Nur empfohlene Blutentnahmesysteme verwenden, s. Seite 7)
2. *BreastSelect Beads* (aus Schritt A6) sorgfältig resuspendieren und jeweils 100  $\mu\text{l}$  Beads pro Blutprobe zusetzen.
3. Die Röhrchen für 15 - 30 min bei Raumtemperatur im Überkopfmischer langsam drehen lassen (~5 rpm).
4. Röhrchen in den MPC-L ohne Magnetschiene stellen und durch Abwärtsschwingen des MPC-L die am Deckel der Gefäße hängenden Blutstropfen ablösen.
5. Den Magnet einsetzen und die Röhrchen für 3 min bei Raumtemperatur im MPC-L stehen lassen.
6. In der Zwischenzeit *Lysis/Binding Buffer* **2** 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.
7. Blutüberstand mit einer 10 ml Pipette vollständig abnehmen und verwerfen.
8. Waschschrirte:
  - a. Den Magneten aus dem MPC-L entfernen.
  - b. 5 ml PBS zugeben, die Röhrchen schließen und 5x über Kopf schwenken womit die Magnetpartikel/Zell-Komplexe schonend resuspendiert werden.
  - c. Den MPC-L mit den Röhrchen zweimal nach unten schwingen, um die am Deckel der Gefäße hängenden Tropfen abzulösen.

- d. Den Magneten in den MPC-L einsetzen und für 1 min bei Raumtemperatur stehen lassen.
- e. Überstand mit einer Pipette vollständig entfernen und verwerfen.

**Waschschritt 2x wiederholen (insgesamt 3x waschen).**

9. Magnet aus dem MPC-L entfernen.
10. Magnetpartikel/Zell-Komplexe in 1 ml PBS resuspendieren und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführen.
11. Reaktionsgefäß in den MPC-S (mit Magnet) 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.
12. Nach 1 min den Überstand mit einer Pipette **vollständig** entfernen und verwerfen. Dies ist wichtig für die anschließende Zellyse!
13. Magnet aus dem MPC-S entfernen.
14. Zugabe von jeweils 200 µl auf Raumtemperatur erwärmten *Lysis/Binding Buffer* [2]. Durch 5maliges Auf-und-ab-pipettieren die Magnetpartikel/Zell-Komplexe resuspendieren.
15. Den Magneten in den MPC-S einsetzen.
16. Überstand (Lysat) nach 1 min vollständig in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführen.
17. Reaktionsgefäß mit den Magnetpartikeln verwerfen.
18. Umgehend mit der mRNA-Isolierung (*AdnaTest BreastCancer-Detect*) beginnen oder Lysat für maximal 2 Wochen bei -20 °C lagern.

## Literatur

Literaturhinweise finden Sie auf unserer Web-Seite.

<http://www.adnagen.com>

## Kurzanleitung

### *AdnaTest BreastCancerSelect*

<b>Bestandteile</b>	<i>BreastSelect Beads</i> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">1</span>
	<i>Lysis/Binding Buffer</i> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">2</span>
<b>Sie benötigen pro Ansatz</b>	5 ml Vollblut ( <i>AdnaCollect</i> oder EDTA-haltiges Blutabnahmesystem, s. Seite 7) 1 x 15 ml Reaktionsgefäß 2 x 1,5 ml Reaktionsgefäße RNase freie 10 ml Pipetten 100 - 1000 µl RNase freie Pipettenspitzen
<b>Hinweis</b>	Für die Separation der <i>BreastSelect Beads</i> werden die Reaktionsgefäße, wenn nicht anders beschrieben, für 1 min in die MPC-L/S gestellt

- Blutstropfen aus dem Deckel schleudern und Probenröhrchen für 3 min in den MPC-L stellen
- Blutüberstand mit der Pipette entfernen
- Waschen der Beads 3x mit 5 ml PBS
- Beads in 1 ml PBS aufnehmen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- Beads im MPC-S separieren und Überstand verwerfen
- Beads in 200 µl *Lysis/Binding Buffer* 2 aufnehmen und mind. 5x auf-und-ab-pipettieren
- Beads im MPC-S abtrennen und Überstand (Zelllysat) in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen

**Weitere Bearbeitung mit dem *AdnaTest BreastCancerDetect* oder Lagerung für max. 2 Wochen bei -20 °C**

### Zellselektion

- *BreastSelect Beads* 1 durch Auf-und-ab-pipettieren gut resuspendieren und 100 µl pro Probe (max. 1000 µl) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- *BreastSelect Beads* mit jeweils 1 ml PBS 3x waschen
- Aufnehmen der *BreastSelect Beads* in PBS (100 µl je Probe)
- 5 ml Vollblut in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe von 100 µl der gewaschenen *BreastSelect Beads* pro 5 ml Blutprobe
- Inkubation im Überkopfmischer für 15 - 30 min bei Raumtemperatur (5 rpm)

**AdnaTest BreastCancerSelect wird vertrieben durch:**

INNOGENETICS N.V.                      Tel: +32 9 329 16 11  
Technologiepark 6  
B-9052 Zwijnaarde, BELGIUM

**Technical Support:**

INNOGENETICS GmbH                      Tel: +49 2867 990 731  
Lembeckerstrasse 19  
D-46359 Heiden  
GERMANY

INNOGENETICS                              Tel: +34 93 270 53 11  
DIAGNOSTICA IBERIA  
S.L. Unipersonal  
C/Tarragona, 161, planta 14  
08014 Barcelona  
SPAIN

INNOGENETICS s.a.r.l.                      Tel: +33 1 69 07 48 34  
Z.A. Courtaboeuf  
Les Conquérants, Bât. Le Kilimandjaro  
8/10 av. des Tropiques  
F-91940 Les Ulis  
FRANCE

INNOGENETICS Srl                         Tel: +39 06 911 80 375  
Via del mare 36  
I-00040 Pomezia  
ITALY