



AdnaTest

BreastCancerSelect

**Enrichissement en cellules cancéreuses à partir du sang
de patients ayant un cancer du sein pour l'analyse de
l'expression génétique**

Pour utilisation diagnostique in vitro

Mode d'emploi



Article nr. 81005/ 810021/ 81024

Table des Matières

Table des Matières.....	2
Information pour les Commandes.....	3
Intention de la Trousse.....	3
Abréviations et Symboles.....	5
Brevets et Noms de Marque Enregistrés	5
Description du Produit.....	6
Composants de la Trousse	8
Matériel Supplémentaire Nécessaire	8
Conservation	9
Recommandations avant Utilisation.....	9
Préparation de l'échantillon.....	10
Manipulations.....	10
Protocole d'Utilisation.....	11
Références	16
Résumé du Mode d'Emploi	17
AdnaTest BreastCancerSelect est distribué par:	20

Information pour les Commandes

AdnaTest BreastCancerSelect et *AdnaTest BreastCancerDetect* sont développés et produits par Adnagen et distribués, vendus et mis sur le marché par Innogenetics.

La trousse *AdnaTest BreastCancerDetect* est destinée à l'analyse de l'expression génétique dans les cellules tumorales sélectionnées en cas de cancer du sein, par isolation de l'ARNm et l'analyse de l'expression génétique subséquente.

De plus amples informations sont disponibles sur le site web :

www.adnagen.com



	Spécifications	Nr. article
<i>AdnaTest BreastCancerSelect</i>	12 Sélections	81005
	24 Sélections	81021
	36 Sélections	81024
<i>AdnaTest BreastCancerDetect</i>	12 Sélections	81004
	24 Sélections	81019
	36 Sélections	81022
<i>AdnaCollect</i>	12 tubes de prélèvement sanguin	81003

Intention de la Trousse

AdnaTest BreastCancerSelect est destinée à l'utilisation diagnostique in vitro.

AdnaTest BreastCancerSelect a été développée pour l'enrichissement en cellules tumorales circulant dans le sang périphérique des patients ayant un cancer du sein.

Abréviations et Symboles

pb	paires de bases
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADN	acide désoxyribonucléique
MPC (-S,-L)	concentreur en particules magnétiques (-petites,- larges)
ARNm	acide ribonucléique messenger
PCR	réaction polymérase en chaîne
RNase	ribonucléase
rpm	révolution par minute
RT	transcription inverse
	date d'expiration
	température de conservation

Brevets et Noms de Marque Enregistrés

Dynabeads est un nom de marque enregistré de Dynal Biotech ASA, Oslo, Norvège.

Description du Produit

AdnaTest BreastCancerSelect permet l'enrichissement immuno-magnétique des cellules tumorales à partir d'antigènes épithéliaux et associés à une tumeur. Les anticorps contre les antigènes épithéliaux et les antigènes associés à une tumeur sont conjugués à des billes magnétiques (Dynabeads) pour le marquage des cellules tumorales dans le sang périphérique. Les cellules marquées sont extraites par le concentrateur de particules magnétiques (MPC) et sont ensuite lysées. (Figure 1).

Le lysat cellulaire est ensuite utilisé pour continuer l'analyse (test à poursuivre avec l'*AdnaTestBreastCancerDetect*).

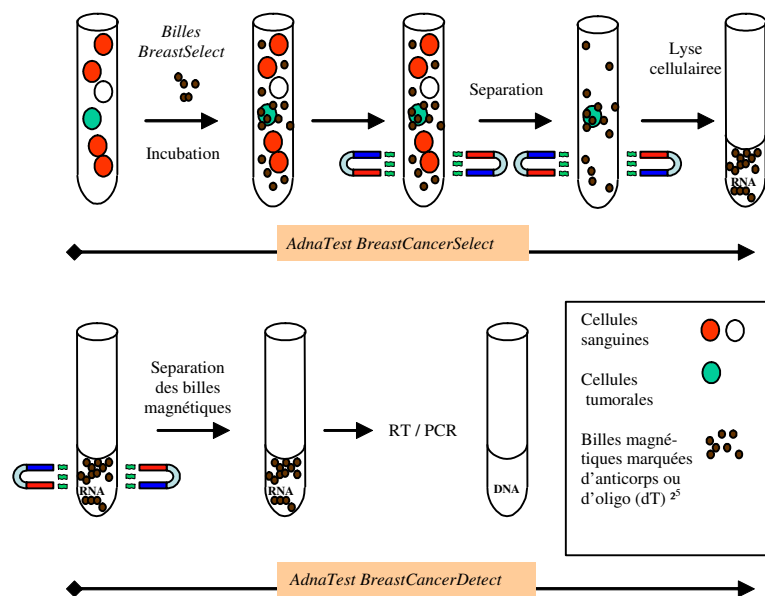


Figure 1 : Vue schématique de la préparation de l'échantillon

Composants de la Trousse

AdnaTest BreastCancerSelect comprend les composants suivants (nombre de tubes) :

Tableau 1 : Composants de la trousse

Composants [Symbole]	81005 (12 tests)	81021 (24 tests)	81024 (36 tests)
<i>Billes BreastSelect</i> [1]	1	2	3
<i>Lysis/Binding Buffer</i> [2]	1	1	1

Matériel Supplémentaire Nécessaire

Equipement :

- Agitateur pour tubes de 15 ml et 1,5 ml
- Concentreur à particules magnétiques MPC-L (DynaL MPC-L, Invitrogen, cat. Nr. 120-21D) et MPC-S (DynaL MPC-S, Invitrogen, cat. Nr. 120-20D)

Matériel:

- Embouts et pipette de 10 ml stériles, en verre ou plastic, RNase-free

- Tubes de réaction stériles et sans RNase de 1,5 ml
- Tubes à centrifuger de 15 ml (utiliser des tubes en polypropylène sans RNase)
- Pipettes (100-1.000 µl), embouts de pipettes sans RNase avec filtre à aérosol
- Gants de protection, lunettes de sécurité

Réactifs :

- Solution phosphate saline tamponnée (PBS), pH 7,2 (Invitrogen, cat nr. 14190-094, D-PBS)

Conservation

Adnatest BreastCancerSelect doit être conservé à 4 °C et ne doit pas être utilisé après la date d'expiration.

Recommandations avant Utilisation

Le test doit être effectué par du personnel qualifié pour l'utilisation des techniques de biologie moléculaire.

Préparation de l'échantillon

- Les échantillons sanguins doivent être prélevés avant l'adjonction de substances thérapeutiques. Nous recommandons fortement de ne pas utiliser l'AdnaTest endéans les 5 jours suivant la dernière intervention thérapeutique.
- Prélèvement du sang : utiliser les tubes de prélèvement sanguin **AdnaCollect** (prod. nr.81003, Adnagen) ou des tubes de prélèvement sanguin contenant de l'**EDTA** comme anticoagulant ('S-Monovette® Kalium EDTA', Sarstedt ; 'BD Vacutainer® K₃EDTA' ; Becton Dickinson). Prélever au moins 5 ml de sang.
- **Le sang doit être conservé au froid (4 °C) ou placé immédiatement sur la glace.**
- **Les échantillons doivent être traités immédiatement ou endéans les 4 heures suivant le prélèvement lors de l'utilisation de tubes EDTA standard ou endéans les 24 heures lors de l'utilisation d'AdnaCollect.**
- Vérifier que l'échantillon sanguin ne soit pas hémolysé.

Manipulations

Les billes *BreastSelect* [1] contiennent de l'azide de sodium comme conservateur. L'azide de sodium est cytotoxique et doit, dès lors, être retiré avant d'utiliser les billes.

- Tous les composants et réactifs supplémentaires fournis par d'autres fournisseurs doivent être conservés selon les instructions. Les avis de sécurité des producteurs respectifs restent valides.
- Porter des gants de protection pour éviter toute contamination par ADN, ARN et RNases.
- Aliquoter les billes *BreastSelect* pour éviter toute contamination.
- La procédure d'emploi doit être suivie dans la séquence indiquée et doit se soumettre à toutes les spécifications instaurées en fonction des temps d'incubation et des températures d'incubation.
- Éliminer les échantillons si les billes de sélection s'agglutinent durant l'enrichissement cellulaire.
- Effectuer le traitement des échantillons et l'analyse consécutive des produits PCR amplifiés dans des locaux différents pour éviter toute contamination.
- Les règles de sécurité et d'hygiène du laboratoire doivent être respectées (par exemple porter des blouses de laboratoire, des lunettes et des gants de protection).

Protocole d'Utilisation

A. Préparation des billes *BreastSelect*

Avant utilisation, il est nécessaire de retirer l'azide de sodium par lavage des billes *BreastSelect* :

1. Remettre les billes *BreastSelect* [1] en suspension en pipetant vigoureusement; ne pas vortexer!
2. Calculer le volume de billes *BreastSelect* [1] requis pour tous les échantillons à tester (100 µl par échantillon) et transférer le volume calculé dans un tube de réaction de 1,5 ml. Si plus de 10 échantillons sont testés utiliser un tube de réaction supplémentaire de 1,5 ml.
3. Placer le tube dans le MPC-S.
4. Après une minute retirer le surnageant avec une pipette.

Important pour chaque procédure :

Ne pas toucher les billes lorsque le surnageant est retiré!

5. Lavage.
 - a. Retirer l'aimant du MPC-S.
 - b. Ajouter 1 ml de PBS (pH 7,2) et remettre les billes en suspension en pipetant plusieurs fois.
 - c. Placer l'aimant dans le MPC-S.
 - d. Après une minute retirer complètement le surnageant. Répéter deux fois (trois lavages au total).
6. Retirer l'aimant du tube et remettre les billes en suspension dans le PBS (pH 7,2) jusqu'au volume original et conserver dans la glace

B. Sélection des Cellules Tumorales

1. Pipeter 5 ml d'échantillon sanguin dans un tube de réaction de 15 ml. (Utiliser seulement les tubes de prélèvement approuvés, voir page 7)
2. Remettre les billes *BreastSelect* en suspension en pipetant (suivant la préparation au point A6) et ajouter 100 µl de ces billes à chaque échantillon sanguin.
3. Faire tourner les tubes lentement (approximativement 5 rpm) pendant 15-30 min à température ambiante sur un appareil permettant l'inclinaison ainsi que la rotation.
4. Mettre les tubes dans le MPC-L sans l'aimant. Retourner le MPC-L afin de libérer dans le tube les gouttes de sang maintenues dans le bouchon.
5. Insérer l'aimant et incubé les tubes dans le MPC-L pendant 3 min à température ambiante.
6. Entretemps remettre le *Lysis/Binding Buffer* [2] à température ambiante.

Remarque : Vérifier que le *Lysis/Binding Buffer* ne contienne pas de précipité. Si un précipité est observé, remettre le tampon à température ambiante et agiter jusqu'à dissolution complète.

7. Retirer le surnageant sanguin complètement avec une pipette de 10 ml sans toucher les billes.
8. Lavage
 - a. Retirer l'aimant du MPC-L.

- b. Ajouter 5 ml (pH 7,2), fermer les tubes et agiter d'avant en arrière lentement et doucement 5 fois de chaque côté du MPC-L pour remettre en suspension le complexe billes magnétiques-cellules.
- c. Secouer le MPC-L contenant les tubes vers le bas 2 fois afin de libérer les gouttes contenues dans le bouchon.
- d. Placer l'aimant dans le MPC-L et incubé 1 min à température ambiante.
- e. Retirer complètement le surnageant.

Répéter 2 fois (trois lavages au total).

9. Retirer l'aimant du MPC-L.
10. Remettre le complexe billes/cellules en suspension dans 1 ml de PBS (pH 7,2) et transférer chaque échantillon dans un tube de 1,5 ml.
11. Placer les tubes dans le MPC-S avec un aimant.

Remarque : L'aimant peut être inséré dans 2 positions. Utiliser *toujours* la position frontale pour être sûr que l'aimant soit le plus près possible du tube de réaction.

12. Après 1 min retirer **complètement** les surnageant pour optimiser la lyse cellulaire qui s'ensuit.
13. Retirer l'aimant du MPC-S.
14. Ajouter 200 µl de *Lysis/Binding Buffer* [2] (RT) à chaque tube de réaction. Remettre en suspension en pipetant au moins 5 fois.

15. Mettre l'aimant dans le MPC-S et incuber pendant 1 min.
16. Transférer les surnageant (lysats cellulaires) dans de nouveaux tubes de réaction de 1,5 ml.
17. Eliminer les tubes contenant les billes.
18. Continuer immédiatement l'isolation de l'ARNm (*Adnatest BreastCancerDetect*) ou conserver le lysat à -20°C mais pas plus de 2 semaines.

Références

Pour les références veuillez vous référer à notre site web.
<http://www.adnagen.com>

Résumé du Mode d'Emploi

AdnaTest *BreastCancerSelect*

Composants	<i>BreastSelect Beads</i> [1] <i>Lysis/Binding Buffer</i> [2]
Nécessaire pour un échantillon	5 ml sang EDTA 1 x tube de réaction de 15 ml 2 x tubes de réaction de 1,5 ml pipettes RNase-free en verre ou en plastic de 10ml pipettes de 100-1000 µl et embouts sans RNase

Protocole

- Remettre en suspension les Billes *BreastSelect* [1] (100 µl par échantillon) et transférer 100 µl pour chaque échantillon de sang dans un tube de réaction de 1,5 ml.
- Laver les Billes *BreastSelect* avec 3 x 1 ml de PBS.
- Remettre en suspension les billes *BreastSelect* dans 100 µl de PBS par échantillon de sang.
- Transférer 5 ml de sang-EDTA dans un tube de réaction de 15 ml.

- Ajouter 100 µl des billes *BreastSelect* lavées à chaque échantillon de sang.
- Incuber pendant 15-30 min à température ambiante sous agitation et rotation à 5 rpm.
- Placer le tube pendant 3 min dans le MPC-L pour séparer les billes (libérer les billes emprisonnées dans le bouchon) en secouant le MPC-L vers le bas.
- Retirer le surnageant.
- Laver les billes avec 3 x 5 ml de PBS.
- Remettre les billes en suspension dans 1ml de PBS et transférer dans un nouveau tube de réaction de 1,5 ml.
- Séparer les billes dans le MPC-S et retirer le surnageant.
- Remettre les billes en suspension dans 200 µl de Lysis/Binding Buffer [2] en pipetant au moins 5 fois.
- Placer les tubes de réaction dans le MPC-S et transférer le surnageant dans un nouveau tube de réaction.

Continuer immédiatement avec *AdnaTest BreastCancerDetect* ou conserver à -20 °C pour 2 semaines maximum.

AdnaTest BreastCancerSelect est distribué par:

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

Support Technique:

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