



AdnaTest ColonCancerSelect

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

Zur in-vitro Diagnose

Gebrauchsanweisung



Artikel-Nr. T-1-504

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 ColonSelect Beads	9
B Selektion von Tumorzellen	10
Literatur	12
Kurzanleitung	13

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	T-1-504
<i>AdnaTest ColonCancerDetect</i>	12 Bestimmungen	T-1-505
<i>AdnaCollect</i>	12 Blutabnahmeröhrchen	T-1-600



Anwendungszweck

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

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

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

Abkürzungen und Symbole

bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
MPC (-S)	Magnetpartikelkonzentrator (small)
<i>AdnaMag</i>	magnetic particle concentrator (-large)
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 ColonCancerSelect* 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 ColonCancerDetect*).

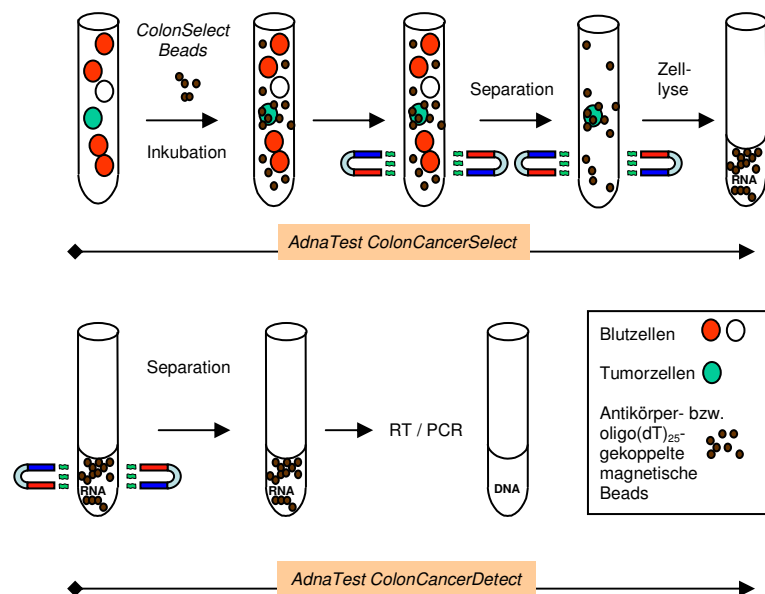


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung.

Kit-Bestandteile

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

Tabelle 1: Kit-Bestandteile

Komponente	Symbol	T-1-504 (12 Best.)
<i>ColonSelect Beads</i>	1	1
<i>Lysis/Binding Buffer</i>	2	1

Vom Anwender bereitzustellen

Geräte:

- Überkopfmischer
- Magnetpartikelkonzentrator *AdnaMag* (AdnaGen AG, cat. no. T-1-700) und MPC-S (Invitrogen, cat. no. 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 ColonCancerSelect* 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® Kalium EDTA', Sarstedt; 'BD Vacutainer® K₃EDTA', 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 *ColonSelect Beads* 1 enthalten Natriumazid (NaN₃) als Bakterizid. NaN₃ 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 *ColonSelect 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 *ColonSelect 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 ColonSelect Beads

Die *ColonSelect Beads* müssen kurz vor der Verwendung gewaschen werden, um das NaN_3 zu entfernen:

1. *ColonSelect Beads* 1 mit einer Pipette sorgfältig resuspendieren; nicht vortexen!
2. Entsprechend der Probenzahl jeweils 100 μl 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 *ColonSelect Beads* nicht berühren!

5. Waschschrirte:
 - a. Magneten aus dem MPC-S herausnehmen.
 - b. 1 ml PBS zugeben; *ColonSelect 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 μl 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. *ColonSelect Beads* (aus Schritt A6) sorgfältig resuspendieren und jeweils 100 μl Beads pro Blutprobe zusetzen.
3. Die Röhrchen für 15 - 30 min bei Raumtemperatur im Überkopfmischer langsam drehen lassen (~20 rpm).
4. Röhrchen in den *AdnaMag* ohne Magnetschiene stellen und durch Abwärtsschwingen des *AdnaMag* die am Deckel der Gefäße hängenden Blutstropfen ablösen.
5. Den Magnet einsetzen und die Röhrchen für 3 min bei Raumtemperatur im *AdnaMag* 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 *AdnaMag* entfernen.
 - b. 5 ml PBS zugeben, die Röhrchen schließen und 5x über Kopf schwenken womit die Magnetpartikel/Zell-Komplexe schonend resuspendiert werden.
 - c. Den *AdnaMag* mit den Röhrchen zweimal nach unten schwingen, um die am Deckel der Gefäße hängenden Tropfen abzulösen.

- d. Den Magneten in den *AdnaMag* 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 *AdnaMag* 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 ColonCancerDetect*) 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 ColonCancerSelect

Bestandteile	<i>ColonSelect Beads</i> 1
	<i>Lysis/Binding Buffer</i> 2
Sie benötigen pro Ansatz	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
Hinweis	Für die Separation der <i>ColonSelect 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 *AdnaMag* 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 ColonCancerDetect* oder Lagerung für max. 2 Wochen bei -20 °C

Zellselektion

- *ColonSelect Beads* 1 durch Auf-und-ab-pipettieren gut resuspendieren und 100 µl pro Probe (max. 1000 µl) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- *ColonSelect Beads* mit jeweils 1 ml PBS 3x waschen
- Aufnehmen der *ColonSelect Beads* in PBS (100 µl je Probe)
- 5 ml Vollblut in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe von 100 µl der gewaschenen *ColonSelect Beads* pro 5 ml Blutprobe
- Inkubation im Überkopfmischer für 15 - 30 min bei Raumtemperatur (20 rpm)

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