



# *AdnaTest ER/PR-Detect*

**PCR-Expressionsanalyse der Östrogen und Progesteron  
Hormonrezeptoren in angereicherten Tumorzellen**

*Zur in-vitro Diagnose*

## **Gebrauchsanweisung**



Artikel-Nr. T-1-532

### **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 .....	8
A Multiplex PCR .....	8
B Fragmentanalyse .....	10
Auswertung .....	11
Literatur .....	12
Fehleranalyse .....	13
Kurzanleitung .....	15

## Bestellinformation

Informationen über unsere Produkte und die Adressen unserer Distributoren finden Sie auf unserer Webseite unter [www.adnagen.com](http://www.adnagen.com).

Das Kit *AdnaTest ER/PR-Detect* kann wie folgt bestellt werden:

	Spezifikation	Art. Nr.
<i>AdnaTest ER/PR-Detect</i>	12 Bestimmungen	T-1-532



## Anwendungszweck

*AdnaTest ER/PR-Detect* ist ein *in-vitro* Diagnostikum und dient dem Expressionsnachweis der Hormonrezeptoren Östrogen und Progesteron in angereicherten Tumorzellen.

Zur Anreicherung zirkulierender Tumorzellen aus peripherem Blut muss der *AdnaTest BreastCancerSelect* benutzt werden.

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

## Abkürzungen und Symbole

bp	Basenpaare
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C-	Negativkontrolle
C+	Positivkontrolle
ER	Östrogen
PR	Progesteron
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.

Das Warenzeichen HotStarTaq wurden von der Firma Qiagen, Hilden, eingetragen.

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

## Produktbeschreibung

CDNA dient als Ausgangsmaterial für eine Multiplex-PCR zum Expressionsnachweis der Hormonrezeptoren Östrogen und Progesteron. Mit Hilfe des *PrimerMix ER/PR-Detect* werden zwei Hormonrezeptor- und ein Kontroll-Gen amplifiziert. Die zu diesem Zweck verwendeten Primer erzeugen Fragmente folgender Größen:

ER : 305 bp  
PR : 270 bp  
Aktin : 119 bp (interne PCR-Kontrolle)

## Kit-Bestandteile

*AdnaTest ER/PR-Detect* enthält die folgenden Komponenten (Anzahl der Gefäße):

**Tabelle 1: Kit-Komponenten**

Komponenten	Symbole	(12 Tests)
<i>PrimerMix ER/PR-Detect</i>	8	1
<i>Positive Control (C+)</i>	9	1

## Vom Anwender bereitzustellen

Geräte:

- Agarosegel-Elektrophorese- und Bilddokumentations-System oder Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)
- Thermocycler

Verbrauchsmittel:

- Sterile, RNase-freie dünnwandige 0,2 ml PCR-Gefäße
- Pipetten (0,5 - 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:

- HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen, z. B. Kat.-Nr. 203443, 250 Units)

## Lagerung

Der *AdnaTest ER/PR-Detect* wird bei -20 °C gelagert und darf nur bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

Um Verunreinigungen und häufige Temperaturwechsel zu vermeiden, sollte der *PrimerMix ER/PR-Detect* [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 Verwendung von Produkten anderer Hersteller als angegeben wird zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Sicherheits- und Hygienebestimmungen des Laborbetriebes sind einzuhalten (z. B. das Tragen von Laborkittel, Schutzbrille, Schutzhandschuhen).

## Protokoll

### A Multiplex PCR

1. HotStarTaq Master Mix (Qiagen), *PrimerMix ER/PR-Detect* [8] und Positivkontrolle (*Positive Control (C+)* [9]) auftauen, vortexen, kurz zentrifugieren und auf Eis stellen.
2. Das Herstellen des PCR Master Mix erfolgt gemäß Tabelle 2. Das Volumen des PCR Master Mix sollte 10 % größer sein als der aus der Probenzahl errechnete Bedarf. Es müssen stets eine Positivkontrolle, eine Negativkontrolle (Wasser) und die RT Kontrolle mitgeführt werden.
3. Pro Reaktionsansatz werden 42 µl des PCR Master Mix in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt.
4. **Hinweis:** Als Negativkontrolle 8 µl Wasser statt cDNA zugeben.

**Tabelle 2: Vorbereitung der multiplex PCR**

Komponenten		Volumen
PCR Master Mix	HotStarTaq Master Mix	25,0 µl
	Destilliertes Wasser	13,0 µl
	PrimerMix ER/PR-Detect <b>8</b>	4,0 µl
Probe	cDNA oder RT-Kontrolle oder Negativkontrolle (Wasser) oder Positive Control (C+) <b>9</b> jeweils:	8,0 µl
<b>Gesamtvolumen</b>		50,0 µl

Die PCR erfolgt in einem Thermocycler mit einer Heizrate von 2 °C / Sekunde nach folgendem Programm (Tabelle 3).

**Tabelle 3: PCR-Programm**

95 °C	15 min	} 37 Zyklen
94 °C	30 sec	
60 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

## B Fragmentanalyse

### Agilent 2100 Bioanalyzer

Es wird empfohlen, die PCR-Produkte mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer und dem DNA 1000 LabChip (Agilent Technologies) zu analysieren. Befolgen Sie die Gebrauchsanweisung zum DNA 1000 LabChip.

Bei Benutzung des Agilent 2100 Bioanalyzer muss laut folgender Beschreibung ein Grenzwert eingestellt werden:

Beim Start der Bioanalyzer Software ‚2100 expert‘ wird ein Default Assay angelegt. Im Hauptmenü unter ‚Instrument Assay‘ wird ‚Electrophoresis > ds1000 > DNA 1000 series II‘ aufgerufen. Mit dieser Einstellung kann die Analyse der PCR-Produkte erfolgen. Im Hauptmenü unter ‚Data > Assay properties‘ wird bei ‚Global normal‘ > ‚sample setpoints‘ der ‚height threshold (FU)‘ auf ‚0‘ gesetzt, um alle Signale zu detektieren.

### Agarosegel

Alternativ werden die PCR-Produkte auf einem 4 %igen Agarosegel 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 mit Agilent 2100 Bioanalyzer

Bei Benutzung des Agilent 2100 Bioanalyzer sind Peaks mit einer Konzentration  $\geq 0,15$  ng/ $\mu$ l für ER sowie  $>0$  ng/ $\mu$ l für PR als positiv zu bewerten.

## Auswertung mit Agarosegel

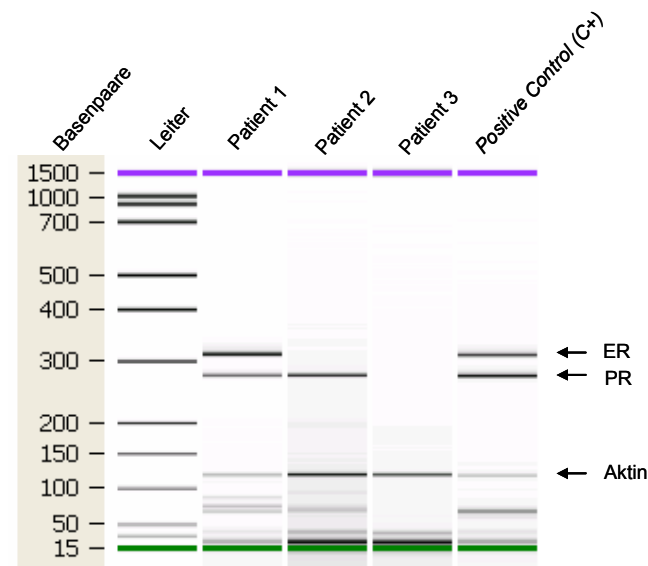
Im Gel sichtbare ER/PR Fragmente sind generell als positiv zu bewerten.

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). Aktin-Fragmente können sehr schwach sein, wenn ER & PR sehr starke Fragmente zeigen.
- In der Negativkontrolle (Wasser) und der RT-Kontrolle dürfen keine Banden sichtbar sein, die größer sind als 80 bp (Primer-Dimere).

### Hinweis:

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



**Abbildung 1: AdnaTest ER/PR-Detect, Patientenprobe,**

Die Abbildung zeigt bei Patient 1 und bei der Positivkontrolle die Expressionsprodukte Östrogen (305 bp) und Progesteron (270 bp), sowie die interne Kontrolle Aktin (119 bp) nach Fragmentanalyse mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer. Patient 2 zeigt die Fragmente von PR und Aktin und Patient 3 nur das Aktin-Fragment.

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

## 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 4 Hinweise auf mögliche Ursachen und Anregungen zur Fehlerbehebung.

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

**Tabelle 4: Fehleranalyse**

Problem	Mögliche Ursachen	Möglichkeiten zur Problembeseitigung
<b>Es treten keine Banden nach der Fragmentanalyse auf.</b>	Pipettierfehler	Wiederholung.
	Probleme mit Reagenzien	Kontrolle der Reagenzien (Lagerung etc.).
	Kontamination mit RNase	Überprüfung von Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und Reagenzien auf RNase-Freiheit. Unbedingt Handschuhe tragen und diese regelmäßig wechseln.
	Keine Identifizierung von Banden wegen schlechter Auftrennung	Überprüfung von Gelkonzentration, Puffern, Laufzeit und angelegter Spannung.

<b>RT-Kontrolle und Negativkontrolle zeigen Fragmente größer als 80 bp.</b>	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.
<b>Schlechte Auftrennung der Banden im Agarosegel</b>	Bedingungen für die Gel-Elektrophorese sind nicht optimal.	Überprüfung der Gelkonzentration und des pH-Wertes des Laufpuffers. Laufzeit beachten.
<b>Diffuse Banden im Agarosegel</b>	Bedingungen für die Gel-Elektrophorese sind nicht optimal.	Überprüfung der Gelkonzentration und des pH-Wertes des Laufpuffers.

## Kurzanleitung

<b>AdnaTest ER/PR-Detect</b>	
<b>Komponenten</b>	<i>PrimerMix ER/PR-Detect</i> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">8</span> <i>Positive Control (C+)</i> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">9</span>
<b>Sie benötigen</b>	0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße. 0,5 - 200 µl Pipette und Pipettenspitzen (RNase frei). 4 % Agarosegel. HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen).

- Lösungen 8 und 9 auftauen und auf Eis stellen.
- Multiplex PCR entsprechend Tabelle 5 und Tabelle 6 durchführen.
- HotStarTaq auftauen, auf Eis stellen und PCR Master Mix laut Tabelle 5 vorbereiten.

**Tabelle 5: Multiplex-PCR**

Komponenten	Volumen	
<b>PCR Master Mix</b>	HotStarTaq Master Mix	25,0 µl
	Destilliertes Wasser	13,0 µl
	<i>PrimerMix ER/PR-Detect</i> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">8</span>	4,0 µl
<b>Probe</b>	cDNA oder RT-Kontrolle oder Negativkontrolle (Wasser) oder <i>Positive Control (C+)</i> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">9</span> jeweils:	8,0 µl
<b>Gesamtvolumen</b>		50,0 µl

**Tabelle 6: PCR-Programm**

95 °C	15 min
94 °C	30 sec
60 °C	30 sec
72 °C	30 sec
72 °C	5 min
4 °C	∞

37 Zyklen

- Für die Fragmentanalyse tragen Sie die RT-Kontrolle, PCR Positiv- und Negativkontrollen auf den Agilent 2100 Bioanalyzer 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](mailto:support@adnagen.com)