



# *AdnaTest ProstateCancerDetect*

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

*Zur in-vitro Diagnose*

## **Gebrauchsanweisung**

**CE** Artikel-Nr. T-1-521

### **Inhaltsverzeichnis**

Bestellinformation .....	3
Anwendungszweck .....	3
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) <sub>25</sub> .....	9
B mRNA Isolierung.....	10
C Reverse Transkription.....	12
D Multiplex PCR .....	14
E Fragmentanalyse .....	15
Auswertung.....	17
Literatur .....	20
Fehleranalyse .....	20
Kurzanleitung .....	23

## Bestellinformation

Informationen über unsere Produkte und die Adressen unserer Distributoren finden Sie auf unserer Webseite unter [www.adnagen.com](http://www.adnagen.com). Die Kits *AdnaTest ProstateCancerSelect* und *ProstateCancerDetect* können wie folgt bestellt werden:



	Spezifikation	Art. Nr.
<i>AdnaTest ProstateCancerSelect</i>	12 Selections	T-1-520
<i>AdnaTest ProstateCancerDetect</i>	12 Detections	T-1-521

## Anwendungszweck

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

*AdnaTest ProstateCancerSelect* dient der Anreicherung zirkulierender Tumorzellen aus peripherem Blut.

## Abkürzungen und Symbole

bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C-	Negativkontrolle
C+	Positivkontrolle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PSA	Prostata-spezifischen Antigens
PSMA	Prostata-spezifisches Membraneantigen
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 (Invitrogen Corporation).

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

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

## Produktbeschreibung

*AdnaTest ProstateCancerDetect* enthält Oligo (dT)<sub>25</sub>-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 ProstateDetect* werden drei Tumormarker und ein Kontroll-Gen amplifiziert. Die zu diesem Zweck verwendeten Primer erzeugen Fragmente folgender Größen:

PSMA : 449 bp  
PSA : 357 bp  
EGFR : 163 bp  
actin : 111 bp (interne PCR-Kontrolle).

## Kit-Bestandteile

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

**Tabelle 1: Kit-Komponenten**

Komponenten	Symbol	T-1-521 (12 Tests)
<i>Lysis/Binding Buffer</i>	3	1
<i>Dynabeads Oligo(dT)<sub>25</sub></i>	4	1
<i>Buffer A</i>	5	1
<i>Buffer B</i>	6	1
<i>10 mM Tris-HCl</i>	7	1
<i>PrimerMix ProstateDetect</i>	8	1
<i>Positive Control (C+)</i>	9	1

## Vom Anwender bereitzustellen

Geräte:

- Überkopfmischer für 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Magnetpartikelkonzentrator MPC-S (DynaL MPC-S, Invitrogen, Prod.-Nr. 120-20D)
- Thermomixer oder Wasserbad (65 °C)
- Thermozykler mit heizbarem Deckel und einer Heizrate von 2 °C/s

- Agarosegel-Elektrophorese- und Bilddokumentationssystem oder dem Agilent 2100 Bioanalyzer (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)
- 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 ProstateCancerDetect* wird bei 4 °C gelagert und darf nur bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. **Lagern Sie die Box mit dem *PrimerMix ProstateDetect* [8] und der *Positive Control* [9] (C+) separat bei -20 °C.**

Um Verunreinigungen und häufige Temperaturwechsel zu vermeiden, sollte der *PrimerMix ProstateDetect* [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)<sub>25</sub>

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)<sub>25</sub>* [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 65 °C vorwärmen.

#### Durchführung

1. 20 µl Dynabeads Oligo(dT)<sub>25</sub> (aus Schritt A7) gut resuspendiert entnehmen und dem Zelllysate (aus Schritt B16 der *AdnaTest ProstateCancerSelect* Gebrauchsanweisung) zusetzen.
2. Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur in einem Überkopfmischer (ca. 5 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 14,75 µl RNase-freiem Wasser.
13. Reaktionsgefäße in einen Thermomixer oder Wasserbad für 5 min bei 65 °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 5,25 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 14,75 µl in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß mit vorgelegtem RT Master Mix geben. Sorgfältig mischen und kurz zentrifugieren. Für die RT-Kontrolle 14,75 µl RNase-freies Wasser statt mRNA zugeben.

**Table 2: Reverse Transcription**

Components			Volume
<b>RT Master Mix</b>	<i>Sensiscript</i> RT Kit (Qiagen)	10x Buffer RT	2.0 µl
		dNTPs	2.0 µl
		<i>Sensiscript</i> Reverse Transcriptase (SRT)	1.0 µl
	RNase Inhibitor, 40 U/µl (Promega)	0.25 µl	
<b>Probe</b>	mRNA/bead-complex or RNase-free H <sub>2</sub> O (as RT Control)		14.75 µl
	<b>Gesamtvolumen</b>		

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

**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 H<sub>2</sub>O, *PrimerMix ProstateDetect* [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 21 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- 4 µl destilliertes H<sub>2</sub>O statt cDNA zugeben.

**Tabelle 4: Vorbereitung der multiplex PCR**

Components			Volumes
<b>PCR Master Mix</b>	<i>HotStarTaq Master Mix</i> Kit (Qiagen)	<i>HotStarTaq Master Mix</i>	12.5 µl
		Destilliertes Wasser	4.5 µl
	<i>PrimerMix ProstateDetect</i> [8]		4.0 µl
<b>Probe</b>	cDNA oder RT-Kontrolle oder Negativkontrolle (Wasser/C-) oder <i>Positive Control (C+)</i> [9] jeweils		4.0 µl
<b>Gesamtvolumen</b>			25.0 µl

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

**Tabelle 5: PCR-Programm**

95 °C	15 min	} 42 cycles
94 °C	30 sec	
61 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

### **E Fragmentanalyse**

Empfohlen wird, die PCR-Produkte mit dem Agilent 2100 Bioanalyser 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 2100 Bioanalyser muss laut folgender Beschreibung ein Grenzwert eingestellt werden:

Beim Start der Bioanalyser 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 1,0 gesetzt werden, um alle Signale zu detektieren. Unter Global *Advanced* kann zusätzlich die

height threshold (FU) der Ladder herabgesetzt werden, wenn eine Bande nicht detektiert wird.

### **Agarose Gel**

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 Agilent 2100 Bioanalyzer sind sämtliche Peaks mit einer Konzentration  $> 0,1 \text{ ng}/\mu\text{l}$  positiv (Abbildung 1). Peaks, deren Konzentration  $< 0,1 \text{ ng}/\mu\text{l}$  sind negativ zu bewerten.

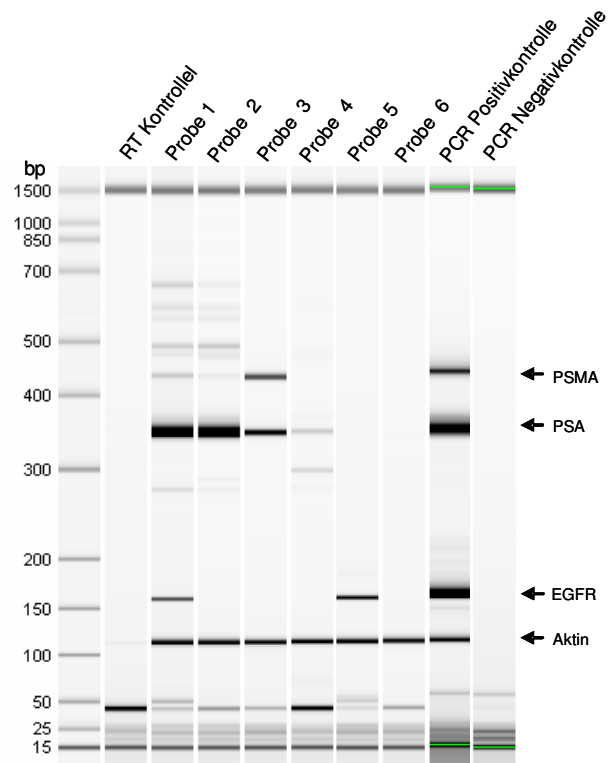
### Zusätzlich müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

- 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 500bp groß ist, deutet auf eine Kontamination mit genomischer DNA hin. Der Separationsprozess war somit nicht erfolgreich und die Ergebnisse müssen verworfen werden.

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

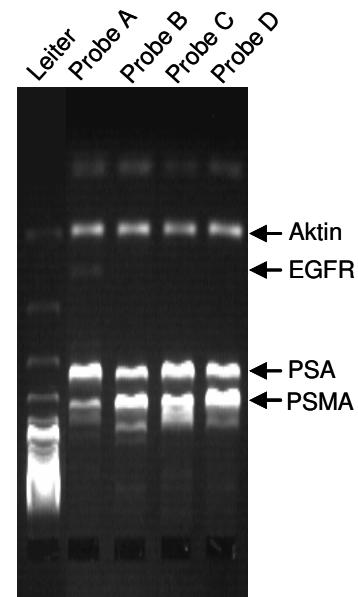
**Jede Abweichung vom Protokoll kann zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen führen.**

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



**Abbildung 1: AdnaTest ProstateCancerDetect an Patientenproben.**

In den ersten beiden Spuren sind der DNA Größenstandard und die RT-Kontrolle zu sehen. Probe 1 ist positiv für PSA und EGFR, Probe 2 nur für PSA und Probe 3 für PSA und PSMA. Die Probe 4 ist schwach positiv für PSA und Probe 5 nur für EGFR. Die Probe 6 ist negativ und zeigt nur ein Aktin Fragment als interne Kontrolle. die PCR Positivkontrolle und PCR Negativkontrolle sind in den letzten beiden Spuren zu sehen.



**Abbildung 2: Analyse durch Gelelektrophorese.**

Probe A ist positiv für alle drei Marker (PSA, PSMA und Aktin). Probe B bis D sind positiv für PSA und PSMA. Alle Probe zeigen ein Aktin Fragment als interne PCR Kontrolle.

## 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 2 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 ProstateCancerSelect* Kit verwiesen.

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

**Tabelle 2: 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 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.
<b>RT-Kontrolle und Negativkontrolle (C-) 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>Diffuse Banden im Agarosegel</b>	Bedingungen für die Gel-Elektrophorese sind nicht optimal.	Überprüfung der Gelkonzentration und des pH-Wertes des Laufpuffers.
<b>Auftreten von Banden größer als 1000 bp</b>	Kontamination mit genomischer DNA	Wiederholung der Anreicherung von Tumorzellen und der RT-PCR.

## Kurzanleitung

### AdnaTest ProstateCancerDetect

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

**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)<sub>25</sub> Beads* **4** (+10 %) mit 20 µl *Lysis/Binding Buffer* **3** pro Probe 2x waschen.
- Zugabe 20 µl gewaschener *Oligo(dT)<sub>25</sub> Beads* **4** zu jedem Zellysat.
- Inkubation in einem Überkopfmischer (ca. 5 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 14,75 µl RNase freies Wasser aufnehmen.
  - Inkubation der Reaktionsgefäß für 5 min bei 65 °C.
  - Anschließend umgehend für mind. 2 min auf Eis stellen.
- 10x Buffer RT und dNTP's auftauen und die reverse Transkription (RT) laut Tabelle 6 und Tabelle 7 durchführen

**Tabelle 6: Reverse Transkription**

Komponenten		Volumen	
<b>RT Master Mix</b>	<i>Sensiscript</i> RT Kit (Qiagen)	10x Buffer RT	2.0 µl
		dNTPs	2.0 µl
	<i>Sensiscript</i> Reverse Transcriptase (SRT)		1.0 µl
	RNase Inhibitor, 40 U/µl (Promega)		0.25 µl
<b>Probe</b>	mRNA-Bead-Komplex oder RNase-freies Wasser (als RT-Kontrolle)	14.75 µl	
<b>Gesamtvolumen</b>		<b>20 µl</b>	

**Tabelle 7: 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 und Tabelle durchführen.

- 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.

**Tabelle 8 Multiplex-PCR**

Komponenten			Volumen
PCR Master Mix	<i>HotStarTaq Master Mix</i> Kit (Qiagen)	<i>HotStarTaq Master Mix</i>	12.5 µl
		Distilled water	4.5 µl
	<i>PrimerMix ProstateDetect</i> [8]		4.0 µl
Probe	cDNA oder RT-Kontrolle oder Negativkontrolle (Wasser/C-) oder Positivkontrolle (C+) [9] jeweils:		4.0 µl
<b>Gesamtvolumen</b>			25,0 µl

**Tabelle 9 PCR-Programm**

95 °C	15 min	] 42 cycles
94 °C	30 sec	
61 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

AdnaGen AG  
Ostpassage 7  
D-30853 Langenhagen  
Germany

Phone +49 (0) 511 725950-50  
Fax +49 (0) 511 725950-40  
E-mail [support@adnagen.com](mailto:support@adnagen.com)