

Marzo 2017

Manuale per AdnaTest ProstateCancerSelect e ProstateCancerDetect



12 (n° di catalogo 395432)



12 (n° di catalogo 396432)

Per arricchimento di cellule tumorali dal sangue intero di pazienti con tumore della prostata e rilevazione dell'espressione genica associata al tumore della prostata nelle cellule tumorali arricchite

Per uso diagnostico in vitro

Versione 1

IVD

CE

REF

395432 (AdnaTest ProstateCancerSelect)
396432 (AdnaTest ProstateCancerDetect)



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R1 **MAT**

1106692IT

Sample to Insight



Indice

Uso previsto	4
Riassunto e spiegazione	4
Principio della procedura	5
AdnaTest ProstateCancerSelect	5
AdnaTest ProstateCancerDetect	6
Materiali in dotazione.....	7
Contenuto del kit.....	7
Materiali necessari ma non in dotazione	9
AdnaTest ProstateCancerSelect	9
AdnaTest ProstateCancerDetect	10
Avvertenze e precauzioni	11
Informazioni per la sicurezza.....	11
Informazioni per l'uso	11
Brevetti.....	11
Conservazione e manipolazione dei reagenti	12
Conservazione.....	12
Manipolazione	12
Conservazione e manipolazione dei campioni.....	13
Preparazione dei campioni.....	13
Protocollo: Arricchimento di cellule tumorali con l'uso di AdnaTest ProstateCancerSelect...	14
Protocollo: Rilevazione dell'espressione genica associata al tumore della prostata nelle cellule tumorali arricchite con l'uso di AdnaTest ProstateCancerSelect.....	18

Protocollo: PCR Multiplex e Singleplex	23
Interpretazione dei risultati	26
Analisi dei frammenti su Agilent 2100 Bioanalyzer	26
Guida alla risoluzione dei problemi.....	30
Controllo di qualità	30
Limitazioni	30
Caratteristiche prestazionali.....	31
Recupero.....	31
Specificità	32
Riproducibilità.....	32
Precisione.....	33
Sostanze interferenti	33
Condizioni interferenti.....	35
Studi clinici.....	35
Bibliografia.....	36
Abbreviazioni	37
Simboli.....	38
Informazioni per gli ordini	39

Uso previsto

AdnaTest ProstateCancerSelect è un metodo diagnostico in vitro destinato all'arricchimento immunochimico di cellule tumorali circolanti (CTC) da campioni di sangue intero anticoagulato ottenuti da pazienti con tumore della prostata attraverso una combinazione di antigeni epiteliali e associati al tumore.

AdnaTest ProstateCancerDetect è un saggio diagnostico in vitro destinato all'analisi di profili di espressione delle cellule tumorali tramite trascrizione inversa e PCR Multiplex e successiva analisi densitometrica dei prodotti della PCR mediante elettroforesi capillare automatica eseguita utilizzando Agilent® 2100 Bioanalyzer.

AdnaTest ProstateCancerSelect/Detect non è destinato a finalità di screening e all'utilizzo come test diagnostico per confermare la presenza di tumore alla prostata.

Questo prodotto è rivolto a utenti professionisti, quali tecnici e medici esperti in tecniche di biologia molecolare.

Riassunto e spiegazione

AdnaTest ProstateCancerSelect consente l'arricchimento immunomagnetico delle cellule tumorali tramite antigeni epiteliali e associati al tumore. AdnaTest ProstateCancerDetect è utilizzato per analizzare, tramite trascrizione inversa e PCR, l'espressione genica associata al tumore della prostata in cellule tumorali arricchite immunomagneticamente.

Principio della procedura

AdnaTest ProstateCancerSelect

Gli anticorpi contro gli antigeni epiteliali e associati al tumore vengono coniugati con le biglie magnetiche per marcare le cellule tumorali nel sangue intero. Le cellule marcate vengono estratte da un concentratore di particelle magnetiche (AdnaMag-L e AdnaMag-S) e successivamente vengono sottoposte a lisi (Figura 1).

Il lisato cellulare è utilizzato per eseguire ulteriori analisi con AdnaTest ProstateCancerDetect.

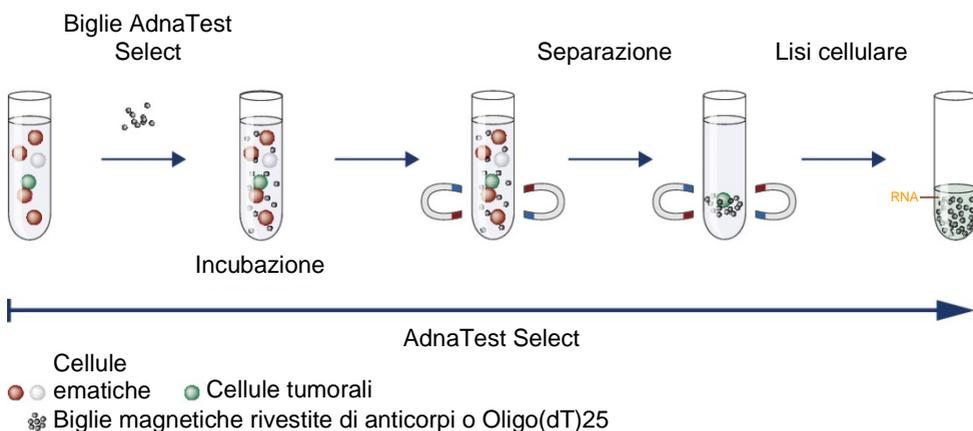


Figura 1. AdnaTest ProstateCancerSelect: selezione immunomagnetica delle cellule con anticorpi associati a tumore multiplo. La prima fase prevede l'arricchimento delle CTC (cellule tumorali circolanti) nel sangue (AdnaTest Select). Questo obiettivo si raggiunge utilizzando particelle (biglie) magnetiche rivestite di anticorpi. Vengono utilizzati diversi anticorpi, che si legano con alta specificità e affinità alle corrispondenti cellule tumorali. Le cellule arricchite vengono sottoposte a lisi e successivamente purificate diverse volte per estrarre l'mRNA.

AdnaTest ProstateCancerDetect

AdnaTest ProstateCancerDetect contiene biglie Oligo (dT)₂₅ per l'estrazione dell'mRNA dal lisato delle cellule tumorali prearricchite. La trascrizione inversa genera il cDNA, che successivamente viene utilizzato come template per la rilevazione delle cellule tumorali e la caratterizzazione mediante PCR Multiplex. AdnaTest PrimerMix ProstateDetect consente l'amplificazione di tre antigeni associati al tumore e di un gene di controllo. AdnaTest PrimerMix AR-Detect consente l'amplificazione del recettore androgenico (AR).

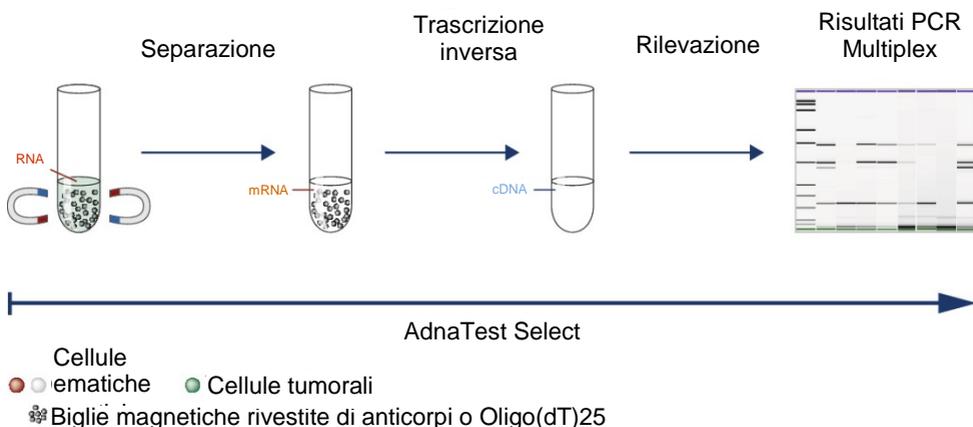


Figura 2. AdnaTest ProstateCancerDetect: PCR Multiplex di vari marcatori tumorali associati al tumore. In una seconda fase le cellule arricchite vengono esaminate mediante RT-PCR per pattern di espressione associati a tumore. I filamenti di mRNA vengono retrotrascritti in cDNA. Successivamente diversi marcatori tumorali associati possono essere amplificati utilizzando PCR Multiplex e visualizzati.

Le due miscele AdnaTest PrimerMix generano i frammenti seguenti:

PrimerMix ProstateDetect [Miscela di primer ProstateDetect]

- PSMA: 449 bp
- PSA: 357 bp

- EGFR: 163 bp
- Actina: 120 bp (controllo PCR interno)

PrimerMix AR-Detect [Miscela di primer AR-Detect]

- AR: 440 bp

Nota: le dimensioni dei frammenti possono variare leggermente. accertarsi di utilizzare i Controlli positivi AdnaTest per l'assegnazione dei segnali rilevati.

Materiali in dotazione

Contenuto del kit

AdnaTest ProstateCancerSelect			
Numero di test		12	
Numero di catalogo		395432	
Provette di raccolta	Collection Tubes (Provette di raccolta) (1,5 ml)	COL TUBE	3 × 5
Provette di raccolta	Collection Tubes (Provette di raccolta) (1,5 ml)	COL TUBE	24
Rosso	ProstateSelect Beads (Biglie ProstateSelect)	PSB	1,2 ml
Rosso	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (Tampone di legame/lisi AdnaTest)	LBB	2 × 1,2 ml
	Manuale		1

AdnaTest ProstateCancerDetect			
N° di catalogo	396432		
Numero di test	12		
Reagenti per RNA AdnaTest	Confezione 1		
Rosso	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (Tampone di legame/lisi AdnaTest)	LBB	2 ml
Arancione	Oligo (dT)25 Beads (Biglie Oligo (dT)25)	OdT	280 µl
Bianco	RNA Purification Buffer A (Tampone per purificazione RNA A)	BA	4 ml
Bianco	RNA Purification Buffer B (Tampone per purificazione RNA B)	BB	4ml
Viola	Tris-HCL Buffer (Tampone Tris-HCL)	TBC	2 ml
AdnaTest ProstateCancerDetect	Confezione 2		
Blu	AdnaTest PrimerMix ProstateDetect (Miscela di primer ProstateDetect AdnaTest)	PMP	144 µl
Arancione	AdnaTest Positive Control Prostate (C+) (Controllo positivo Prostata AdnaTest (C+))	CONTROL +	40 µl
Giallo	AdnaTest PrimerMix AR-Detect (Miscela di primer AR-Detect AdnaTest)	PMA	144 µl
Rosa	AdnaTest Positive Control AR (C+) [Controllo positivo AR AdnaTest (C+)]	CONTROL +	40 µl
	Manuale		1

I reagenti AdnaTest ProstateCancerDetect sono forniti in quantità sufficiente per analizzare 6 controlli PCR e 12 campioni di sangue.

Materiali necessari ma non in dotazione

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione. Per maggiori informazioni, consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) disponibili presso il fornitore.

AdnaTest ProstateCancerSelect

Attrezzatura

- Rotatore per provette da 15 ml e 1,5 ml (p. es., ELMi Ltd., n. cat. IMIX-03)
- Concentratori di particelle magnetiche
 - AdnaMag-L (n. cat. 399921)
 - AdnaMag-S (n. cat. 399911)

Materiale

- AdnaTube Tubes (Provette AdnaTube) (n. cat. 399932), quando si opera con provette con la soluzione di ACD-A BD Vacutainer®
- Pipette di plastica o vetro da 10 ml sterili, prive di RNasi e pipettatore
- Sterile, RNase-free 1.5 ml reaction tubes (Provette di reazione da 1,5 ml, sterili, prive di RNasi) (p. es., Sarstedt, n. cat. 72.690)
- Pipette e puntali per pipette privi di RNasi, provvisti di barriera antiaerosol, idonei per pipettare volumi tra 100 µl e 1000 µl

Reagenti

- Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.0–7.3 (Tampone fosfato salino (PBS), pH 7,0-7,3) (p. es., Fisher, n. cat. VX14190169, D-PBS)

AdnaTest ProstateCancerDetect

Attrezzatura

- Tube rotator for 1.5 ml tubes (Rotatore per provette da 1,5 ml) (p. es., ELMi Ltd., n. cat. IMIX-03)
- Magnetic particle concentrator AdnaMag-S (Concentratore di particelle magnetiche AdnaMag-S) (n. cat. 399911)
- Blocco termico o bagnomaria (65°C)
- Termociclatore con coperchio riscaldato e velocità di riscaldamento di 2°C/sec.
- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)

Materiale

- Provette per PCR da 0,2 ml, a parete sottile, sterili, prive di RNasi
- Sterile, RNase-free 1.5 ml reaction tubes (Provette di reazione da 1,5 ml, sterili, prive di RNasi) (p. es., Sarstedt, n. cat. 72.690)
- Pipette e puntali per pipette privi di RNasi, provvisti di barriera antiaerosol, idonei per pipettare volumi tra 1 µl e 200 µl

Reagenti

- Sensiscript® RT Kit (Kit Sensiscript® RT) (QIAGEN, n. cat. 205211, 50 reazioni)
 - **Nota:** il Sensiscript RT Kit (Kit Sensiscript® RT) (n. cat. 205211) è sufficiente per 25 campioni soltanto, perché per ogni reazione occorre un volume doppio.
- Recombinant RNAsin, RNase-inhibitor, 2500 U (RNAsin ricombinante, RNase-inibitore, 2500 U) (Promega, n. cat. N2511)
- HotStarTaq® Master Mix Kit (Kit HotStarTaq® Master Mix) (QIAGEN, n. cat. 203443, 250 U)
- Ghiaccio tritato

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro

Informazioni per la sicurezza

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione. Per maggiori informazioni consultare le apposite schede di dati di sicurezza (SDS). Le schede sono disponibili online nel pratico formato PDF sul sito www.qiagen.com/safety, dove è possibile cercare, visualizzare e stampare la scheda SDS di ogni kit e di ogni componente del kit QIAGEN.

Smaltire i campioni e i materiali di scarto secondo le disposizioni locali in materia di sicurezza.

Informazioni per l'uso

Questi test devono essere eseguiti da personale competente nelle tecniche di biologia molecolare.

Brevetti

AdnaTest ProstateCancerDetect è disponibile su licenza di Hoffmann-La Roche AG, Basel. L'acquisto di AdnaTest ProstateCancerDetect non autorizza l'utente a eseguire la PCR senza licenza.

Conservazione e manipolazione dei reagenti

Conservazione

Il sistema AdnaTest ProstateCancer viene fornito in tre confezioni. Conservare AdnaTest ProstateCancerSelect (n. cat. 395432) e AdnaTest RNA Reagent Box 1 (confezione 1 di n. cat. 396432) a 2–8°C. Non utilizzare nessun componente oltre la data di scadenza.

Conservare separatamente AdnaTest ProstateCancerDetect Box 2 (confezione 2 di n. cat. 396432), contenente le miscele di primer AdnaTest e i controlli positivi AdnaTest, tra –30 e –15°C. Per evitare eventuali contaminazioni e ripetute variazioni di temperatura, aliquotare la miscela di primer. Non utilizzare i componenti oltre la data di scadenza.

Manipolazione

- Le Biglie ProstateSelect contengono azoturo di sodio come conservante. L'azoturo di sodio è citotossico, pertanto deve essere rimosso prima di utilizzare le biglie. (Vedere "Protocollo: Arricchimento di cellule tumorali con l'uso di AdnaTest ProstateCancerSelect", pag. 14).
- Tutti i componenti e i reagenti supplementari procurati da altri fornitori devono essere conservati secondo le rispettive istruzioni. Rispettare le informazioni per la sicurezza dei rispettivi produttori.
- Indossare guanti di protezione per evitare la contaminazione con DNA, RNA e RNasi.
- Aliquotare le Biglie ProstateSelect per evitare la contaminazione.
- Il test deve essere eseguito nella sequenza descritta e deve essere conforme a tutte le specifiche dichiarate rispetto a tempi e temperature di incubazione.
- Scartare i campioni in caso di agglutinazione delle biglie durante l'arricchimento cellulare.

- Le procedure di trattamento dei campioni, tra cui la trascrizione inversa e la successiva analisi dei prodotti della PCR amplificati, devono essere eseguite preferibilmente in stanze diverse per evitare contaminazioni crociate.
- L'uso di prodotti di fornitori diversi da quelli consigliati può incidere negativamente sui risultati.
- Osservare le disposizioni in materia di igiene e sicurezza del laboratorio (p. es., indossare camici da laboratorio, occhiali e guanti di protezione).

Conservazione e manipolazione dei campioni

Preparazione dei campioni

- I campioni di sangue devono essere prelevati prima dell'assunzione di sostanze terapeutiche. Non utilizzare AdnaTest ProstateCancerSelect se non sono trascorsi 7 giorni dall'ultimo intervento terapeutico!
- Prelievo ematico: se il trasporto dei campioni richiede meno di 4 ore, utilizzare provette contenenti EDTA come anticoagulante (p. es., S Monovette® K3 EDTA, Sarstedt [n. cat. 01.1605.001]) per il prelievo di almeno 7,5 ml di sangue intero.
- Se il trasporto dei campioni richiede più di 4 ore, utilizzare provette con la soluzione di ACD-A BD Vacutainer (Becton Dickinson GmbH, n. cat. 366645 [EU]; 364606 [US]) per il prelievo di almeno 8,5 ml di sangue intero. Prima dell'ulteriore trattamento utilizzando l'AdnaTest, 5 ml di sangue in soluzione di ACD-A devono essere trasferiti in una provetta per campionamento AdnaTube, n. cat. 399932.
- Conservare immediatamente il sangue a 4-8°C.
- I campioni devono essere trattati il prima possibile e comunque entro 4 ore dal prelievo ematico se si utilizzano provette con EDTA oppure entro 30 ore se si utilizzano provette per la raccolta del sangue BD Vacutainer in combinazione con provette AdnaTube.
- Il campione di sangue non deve essere emolizzato.

Protocollo: Arricchimento di cellule tumorali con l'uso di AdnaTest ProstateCancerSelect

Accorgimenti importanti prima di iniziare

- Prima di avviare la procedura, leggere "Avvertenze e precauzioni" (pag. 11), "Conservazione e manipolazione dei reagenti" (pag. 12) e "Conservazione e manipolazione dei campioni" (pag. 13).
- È necessario rimuovere l'azoturo di sodio lavando le Biglie ProstateSelect prima dell'uso, come descritto di seguito in "Procedura A: Preparazione delle Biglie ProstateSelect".
- Utilizzare le provette di raccolta da 1,5 ml fornite solo per la fase del protocollo indicata.

Ulteriori accorgimenti prima di iniziare

- Accertarsi che il tampone di legame/lisi AdnaTest sia termostato a temperatura ambiente. In presenza di un precipitato, equilibrare il reagente a temperatura ambiente e miscelarlo fino al completo scioglimento del precipitato.

Procedura A: Preparazione delle Biglie ProstateSelect

1. Risospendere con cura le Biglie ProstateSelect pipettando; non agitare in vortex!
2. Calcolare il volume delle Biglie ProstateSelect necessarie per tutti i campioni da trattare (100 µl per campione) e trasferire il volume calcolato in una provetta di reazione da 1,5 ml (non in dotazione).

Se vengono trattati più di 10 campioni, utilizzare altre provette di reazione da 1,5 ml (non in dotazione).

3. Posizionare la provetta nell'AdnaMag-S.
4. Dopo 1 minuto rimuovere il sopranatante con una pipetta.

Nota: non toccare le biglie durante la rimozione del sopranatante!

5. Fasi di lavaggio:

- 5a. Rimuovere la guida magnetica dall'AdnaMag-S.
 - 5b. Aggiungere 1 ml di tampone PBS e risospendere le biglie con pipettamenti ripetuti.
 - 5c. Posizionare la guida magnetica nell'AdnaMag-S.
 - 5d. Dopo 1 minuto rimuovere completamente il sopranatante con una pipetta.
 - 5e. Ripetere le fasi da 5a a 5d due volte (tre lavaggi in totale).
6. Rimuovere la provetta dall'AdnaMag-S e risospendere le biglie nel tampone PBS fino al volume originale (100 µl per campione). Procedere con la "Procedura B: selezione delle cellule tumorali" seguente.

Procedura B: selezione delle cellule tumorali

1. Se si utilizzano provette con EDTA standard, pipettare 5 ml di un campione di sangue in una provetta di raccolta da 15 ml.
Se si utilizza sangue in soluzione di ACD-A in una provetta con la soluzione di ACD-A BD Vacutainer, trasferire 5 ml di sangue in un'AdnaTube.
Nota: Le AdnaTube sono obbligatorie se si utilizzano provette con la soluzione di ACD-A BD Vacutainer.
2. Risospendere con cura le Biglie ProstateSelect (preparate nella fase 6 della Procedura A) pipettandole e aggiungendone 100 µl in ogni campione di sangue.
3. Ruotare le provette lentamente (circa 5 rpm) per 30 minuti a temperatura ambiente su un dispositivo che esegue movimenti rotatori e basculanti.
4. Posizionare le provette nell'AdnaMag-L senza la guida magnetica. Fare oscillare l'AdnaMag-L verso il basso per liberare le gocce di sangue catturate nel tappo.
5. Inserire la guida magnetica e incubare le provette nell'AdnaMag-L per 3 minuti a temperatura ambiente.
6. Rimuovere completamente il sopranatante ematico con una pipetta da 10 ml, senza toccare le biglie.

Nota: Non toccare le biglie durante la rimozione del sopranatante!

7. Fasi di lavaggio:

- 7a. Rimuovere la guida magnetica dall'AdnaMag-L.
 - 7b. Aggiungere 5 ml di tampone PBS. Chiudere le provette e agitare delicatamente l'AdnaMag-L in avanti e indietro per 5 volte, in modo da risospendere i complessi biglia magnetica/cellula.
 - 7c. Fare oscillare l'AdnaMag-L con le provette verso il basso per due volte, in modo da liberare le gocce catturate nel tappo.
 - 7d. Posizionare la guida magnetica nell'AdnaMag-L e incubare per 1 minuto a temperatura ambiente.
 - 7e. Rimuovere completamente il sopranatante con una pipetta.
 - 7f. Ripetere le fasi da 7a a 7e due volte (tre lavaggi in totale).
8. Rimuovere la guida magnetica dall'AdnaMag-L.
9. Risospendere i complessi biglia magnetica/cellula in 1 ml di tampone PBS e trasferire ogni campione in una provetta di reazione da 1,5 ml (non in dotazione).
10. Posizionare le provette di reazione nell'AdnaMag-S con una guida magnetica inserita.
- Nota:** la guida magnetica dell'AdnaMag-S può essere inserita in due posizioni. Inserire sempre la guida con la pellicola di plastica bianca rivolta in avanti per assicurare che i magneti siano vicini alle provette di reazione.
11. Dopo 1 minuto rimuovere completamente il sopranatante con una pipetta per ottimizzare la lisi cellulare successiva!
12. Rimuovere la guida magnetica dall'AdnaMag-S.
13. Aggiungere 200 µl di tampone di legame/lisi AdnaTest (termostatato a temperatura ambiente) in ogni provetta di reazione. Risospendere pipettando almeno cinque volte.
14. Inserire la guida magnetica nell'AdnaMag-S e incubare per 1 minuto.
15. Trasferire il sopranatante (lisato cellulare) in nuove provette di reazione da 1,5 ml.
16. Scartare le provette con le biglie.

17. Proseguire immediatamente con l'estrazione dell'mRNA (vedi "Protocollo: Rilevazione dell'espressione genica associata al tumore della prostata nelle cellule tumorali arricchite con l'uso di AdnaTest ProstateCancerSelect", pag. 18) o conservare i lisati cellulari a –20°C per 2 settimane al massimo.

Protocollo: Rilevazione dell'espressione genica associata al tumore della prostata nelle cellule tumorali arricchite con l'uso di AdnaTest ProstateCancerSelect

Accorgimenti importanti prima di iniziare

- Prima di avviare la procedura, leggere "Avvertenze e precauzioni" (pag. 11) e "Conservazione e manipolazione dei reagenti" (pag. 12).
- Le procedure da A a C descrivono l'estrazione dell'mRNA e la trascrizione inversa.
- Utilizzare le provette di raccolta da 1,5 ml fornite solo per la fase del protocollo indicata.

Ulteriori accorgimenti prima di iniziare

- Accertarsi che il tampone di legame/lisi AdnaTest sia termostatato a temperatura ambiente. In presenza di un precipitato, equilibrare il reagente a temperatura ambiente e miscelarlo fino al completo scioglimento del precipitato.
- Equilibrare il tampone per purificazione RNA A e il tampone per purificazione RNA B a temperatura ambiente. Collocare il tampone Tris-HCl su ghiaccio.
- Scongelare 10x tampone RT e dNTP, dal Sensiscript RT Kit, a temperatura ambiente. Miscelare in vortex. Centrifugare brevemente e conservare su ghiaccio. Scongelare l'acqua priva di RNasi (inclusa nel Sensiscript RT Kit).
- Regolare un blocco termico o un bagnomaria a 65°C.

Procedura A: preparazione di Oligo (dT)₂₅ Beads (Biglie Oligo (dT)₂₅)

1. Risospendere con cura le biglie Oligo(dT)₂₅ Beads pipettando prima dell'uso; non agitare in vortex!
2. Calcolare il volume delle biglie necessarie per tutti i campioni da trattare (20 µl per campione, più 10%) e trasferire il volume calcolato in una provetta di reazione da 1,5 ml priva di RNasi (non in dotazione).
3. Posizionare la provetta nell'AdnaMag-S.

Nota: la guida magnetica dell'AdnaMag-S può essere inserita in due posizioni. Inserire sempre la guida con la pellicola di plastica bianca rivolta in avanti per assicurare che i magneti siano vicini alle provette di reazione.

4. Dopo 1 minuto rimuovere il sopranatante con una pipetta.
5. Fasi di lavaggio:
 - 5a. Rimuovere la guida magnetica dall'AdnaMag-S.
 - 5b. Aggiungere il volume originale (fase 2, pag. 19) di tampone di legame/lisi AdnaTest e risospendere le biglie con pipettamenti ripetuti. Risospendere con delicatezza per evitare la formazione di schiuma.
 - 5c. Inserire la guida magnetica nell'AdnaMag-S.
 - 5d. Dopo 1 minuto rimuovere completamente il sopranatante.
 - 5e. Ripetere le fasi da 5a a 5d una volta (due lavaggi in totale).
6. Rimuovere la provetta dall'AdnaMag-S e risospendere le biglie nel tampone di legame/lisi AdnaTest fino al volume originale (fase 2, pag. 19). Procedere con "Procedura B: estrazione dell'mRNA".

Procedura B: estrazione dell'mRNA

1. Aggiungere 20 µl di biglie Oligo(dT)₂₅ (passaggio 6, precedente) a ciascuna provetta contenente il lisato cellulare (passaggio 15, pag. 16).
2. Ruotare le provette lentamente (circa 5 rpm) per 10 minuti a temperatura ambiente su un dispositivo che esegue movimenti rotatori e basculanti.
3. Posizionare le provette nell'AdnaMag-S senza la guida magnetica. Fare oscillare l'AdnaMag-S verso il basso per liberare le biglie e il liquido catturato nel tappo.
4. Inserire la guida magnetica e rimuovere il soprnatante dopo 1 minuto.
5. Fasi di lavaggio 1:
 - 5a. Rimuovere la guida magnetica dall'AdnaMag-S.
 - 5b. Aggiungere 100 µl di tampone per purificazione RNA A in ogni provetta e risospendere le biglie con pipettamenti ripetuti. Per evitare la perdita di biglie, lavare accuratamente il tappo e la parete della provetta.
 - 5c. Inserire la guida magnetica nell'AdnaMag-S.
 - 5d. Dopo 1 minuto rimuovere completamente il soprnatante.
 - 5e. Ripetere le fasi da 5a a 5d una volta (due lavaggi in totale).
6. Fasi di lavaggio 2:
 - 6a. Rimuovere la guida magnetica dall'AdnaMag-S.
 - 6b. Aggiungere 100 µl di tampone per purificazione RNA B a ciascuna provetta. Risospendere le biglie pipettando e trasferire in nuove provette di reazione da 1,5 ml (in dotazione).
 - 6c. Inserire la guida magnetica nell'AdnaMag-S.
 - 6d. Dopo 1 minuto rimuovere completamente il soprnatante. Questo passaggio deve essere eseguito con delicatezza (attenzione al pellet) poiché le biglie possono scivolare e potrebbero venire rimosse erroneamente.
 - 6e. Ripetere i passaggi da 6a a 6d una volta nelle stesse provette di reazione (due lavaggi in totale).

7. Rimuovere la guida magnetica dall'AdnaMag-S.
8. Aggiungere 100 µl di tampone Tris-HCl ghiacciato in ogni provetta e risospendere le biglie tramite pipettamento.
9. Inserire la guida magnetica nell'AdnaMag-S.
10. Dopo 1 minuto rimuovere completamente il soprantante.
11. Rimuovere la guida magnetica dall'AdnaMag-S.
12. Risospendere il complesso mRNA/biglia in 14,75 µl di acqua priva di RNasi.
13. Trasferire le provette in un blocco termico o bagnomaria e incubare per 5 minuti a 65°C.
14. Collocare immediatamente le provette su ghiaccio per almeno 2 minuti.
15. Proseguire immediatamente (entro 5 minuti) con trascrizione inversa (Procedura C: trascrizione inversa con uso del Sensiscript RT Kit).
Non conservare il complesso mRNA/biglia!

Procedura C: trascrizione inversa con uso del Sensiscript RT Kit

1. Preparare la soluzione RT Master Mix su ghiaccio. Per preparare la soluzione RT Master Mix, fare riferimento alla Tabella 1 tenendo conto del numero di campioni.
Il volume della soluzione RT Master Mix deve essere calcolato aggiungendo un 10% in più al numero totale di reazioni di trascrizione inversa. È sempre necessario preparare una reazione di controllo negativo senza l'aggiunta di mRNA (controllo RT).
2. Agitare la soluzione RT Master Mix in vortex. Centrifugare brevemente e pipettare 5,25 µl per ogni reazione nelle provette per PCR da 0,2 ml.
3. Risospendere con delicatezza i complessi mRNA/biglie (passaggio 12, pag. 21) utilizzando una pipetta. Trasferire il volume totale nella provetta di reazione per PCR da 0,2 ml che contiene la soluzione RT Master Mix. Miscelare bene con pipettamenti ripetuti.

Tabella 1. Impostazione reazioni di trascrizione inversa

Componente	Volume
RT master mix	
10x Buffer RT (10x tampone RT)	2,0 µl
Miscela di dNTP (5 mM di ciascun dNTP)	2,0 µl
RNase inhibitor (Inibitore della RNasi), 40 U/µl (Promega)	0,25 µl
Sensiscript Reverse Transcriptase (Sensiscript trascrittasi inversa) (SRT)	1,0 µl
Templato RNA*	14,75 µl
mRNA/bead complex or RNase free water (complesso mRNA/biglia o acqua priva di RNasi)	
Volume totale	20,0 µl

* Come controllo RT aggiungere 14,75 µl di acqua priva di RNasi al posto del complesso mRNA/biglia. Il volume del composto mRNA/biglia potrebbe variare leggermente. In ogni caso utilizzare il volume totale per la trascrizione inversa!

4. Il cDNA è sintetizzato in un termociclatore alle condizioni seguenti (Tabella 2).

Tabella 2. Programma trascrizione inversa

Temperatura	Durata
37°C	60 minuti
93°C	5 minuti
4°C	∞

5. Collocare le provette di reazione con il cDNA su ghiaccio o conservare a -20°C per 4 settimane al massimo.

Proseguire con "Protocollo: PCR Multiplex e Singleplex", pag. 22.

Protocollo: PCR Multiplex e Singleplex

Note importanti prima di iniziare

- Prima di avviare la procedura, leggere "Avvertenze e precauzioni" (pag. 11) e "Conservazione e manipolazione dei reagenti" (pag. 12).

Ulteriori accorgimenti prima di iniziare

- Scongellare HotStarTaq Master Mix (QIAGEN), AdnaTest PrimerMix ProstateDetect, AdnaTest Positive Control Prostate, AdnaTest PrimerMix AR-Detect, AdnaTest Positive Control AR e acqua priva di RNasi. Agitare, centrifugare brevemente e conservare su ghiaccio.

Procedura A: PCR Multiplex (AdnaTest ProstateDetect)

1. Per preparare la soluzione PCR Master Mix, fare riferimento alla Tabella 3 tenendo conto del numero di campioni.

Il volume della soluzione PCR Master Mix deve essere calcolato aggiungendo almeno un 10% di volume in eccesso. Ricordarsi di includere sempre un AdnaTest Positive Control Prostate, acqua priva di RNasi come controllo negativo e il controllo RT.

2. Per ogni preparazione dispensare 21,0 μ l della soluzione PCR Master Mix nelle provette di reazione per PCR da 0,2 ml. Risospendere la miscela cDNA/biglia pipettandola e aggiungendone 4,0 μ l in ogni provetta di reazione.

Nota: come controllo negativo aggiungere 4,0 μ l di acqua priva di RNasi al posto del cDNA.

Tabella 3. Preparazione della miscela PCR Multiplex

Componente	Volume
PCR Multiplex Master Mix	
HotStarTaq Master Mix	12,5 µl
RNase-free water (Acqua priva di RNasi)	4,5 µl
PrimerMix ProstateDetect [Miscela di primer ProstateDetect]	4,0 µl
cDNA oppure controllo RT oppure controllo negativo (acqua priva di RNasi) oppure controllo positivo (C+) cad.:	4,0 µl
Volume totale	25,0 µl

3. Per la PCR viene utilizzato un termociclatore che segue il programma descritto nella Tabella 4. Azionare il termociclatore con una rampa di 2°C/sec. La PCR prevede 42 cicli in totale.

Tabella 4. Programma di ciclaggio PCR

	Temperatura	Durata
Fase di attivazione iniziale	95°C	15 minuti
Ciclaggio a 3 fasi		
Denaturazione:	94°C	30 secondi
Annealing:	61°C	30 secondi
Estensione:	72°C	30 secondi
Numero di cicli:	42	
Estensione finale:	72°C	10 minuti
Raffreddamento:	4°C	∞

Procedura B: PCR Singleplex (AdnaTest AR-Detect)

1. Per preparare la soluzione PCR Master Mix, fare riferimento alla Tabella 5 tenendo conto del numero di campioni.

Il volume della soluzione PCR Master Mix deve essere calcolato aggiungendo almeno un 10% di volume in eccesso. Ricordarsi di includere sempre un AdnaTest Positive Control, acqua priva di RNasi come controllo negativo e il controllo RT.

- Per ogni preparazione dispensare 21,0 µl della soluzione PCR Master Mix nelle provette di reazione per PCR da 0,2 ml. Risospendere la miscela cDNA/biglia pipettandola e aggiungerne 4,0 µl in ogni provetta di reazione.

Nota: come controllo negativo aggiungere 4,0 µl di acqua priva di RNasi al posto del cDNA.

Tabella 5. Preparazione della miscela PCR Singleplex

Componente	Volume
PCR Singleplex Master Mix	
HotStarTaq Master Mix	12,5 µl
RNase-free water (Acqua priva di RNasi)	4,5 µl
PrimerMix AR-Detect [Miscela di primer AR-Detect]	4,0 µl
cDNA oppure controllo RT oppure controllo negativo (acqua priva di RNasi) oppure controllo positivo (C+) cad.:	4,0 µl
Volume totale	25,0 µl

- Per la PCR viene utilizzato un termociclatore che segue il programma descritto nella Tabella 6. Azionare il termociclatore con una rampa di 2°C/sec. La PCR prevede 35 cicli in totale.

Tabella 6. Programma di ciclaggio PCR

	Temperatura	Durata
Fase di attivazione iniziale	95°C	15 minuti
Ciclaggio a 3 fasi (35 cicli)		
Denaturazione:	94°C	30 secondi
Annealing:	60°C	30 secondi
Estensione:	72°C	60 secondi
Numero di cicli:	35	
Estensione finale:	72°C	10 minuti
Raffreddamento:	4°C	∞

Interpretazione dei risultati

Analisi dei frammenti su Agilent 2100 Bioanalyzer

L'analisi con Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) viene eseguita su DNA 1000 LabChip®. Attenersi alle istruzioni contenute nel manuale del DNA 1000 LabChip e fare attenzione a non trasferire nessuna biglia nel LabChip. Le biglie magnetiche nel gel possono causare risultati non validi.

1. Avviare il software Bioanalyzer **2100 expert**. In **"Contexts"** (Contesti) selezionare **"Instrument"** (Strumento), quindi cliccare sul pulsante **"Assay"** (Saggio) vicino ad **"Assay Selection"** (Selezione del saggio).
2. Selezionare **"Electrophoresis > DNA 1000 Series II.xsy"** (Elettroforesi > DNA 1000 Series II.xsy). Preparare il chip e avviare la seduta.

3. Per la valutazione dei risultati impostare una soglia di rilevazione:

- 3a. In **“Contexts”** selezionare **“Data”** (Dati) e cliccare sulla scheda **“Assay Properties”** (Proprietà del saggio). Sulla destra selezionare **“Global”** (Globali) e **“Normal”** (Normali) nel menu a discesa.
- 3b. Selezionare **“Sample Setpoints > Integrator > height threshold (FU)”** [Setpoint campione > Integratore > Soglia altezza (FU)] e impostare questo valore su **0** (il valore predefinito è **20**) per rilevare tutti i segnali.

Analisi dei risultati per AdnaTest ProstateDetect

Il test è da considerarsi positivo se viene rilevato chiaramente un frammento della PCR di almeno un trascritto associato al tumore (PSMA, PSA o EGFR).

Con l'uso di Agilent 2100 Bioanalyzer i picchi con una concentrazione $\geq 0,10$ ng/ μ l sono positivi (Figura 3).

Il frammento di actina del gene di controllo deve essere rilevato in tutti i campioni dei pazienti (controllo PCR interno). Un segnale di actina costituisce un controllo positivo per la riuscita della separazione cellulare, della trascrizione inversa e della PCR Multiplex. Nei campioni di controllo negativo e controllo RT non devono esserci bande di più di 80 coppie di basi (dimeri primer).

Un frammento più grande di 900 bp indica contaminazione con DNA genomico. Il processo di separazione non è riuscito e i risultati in questo caso non sono validi.

IMPORTANTE: se il protocollo non viene seguito esattamente può determinare risultati falsi negativi o falsi positivi.

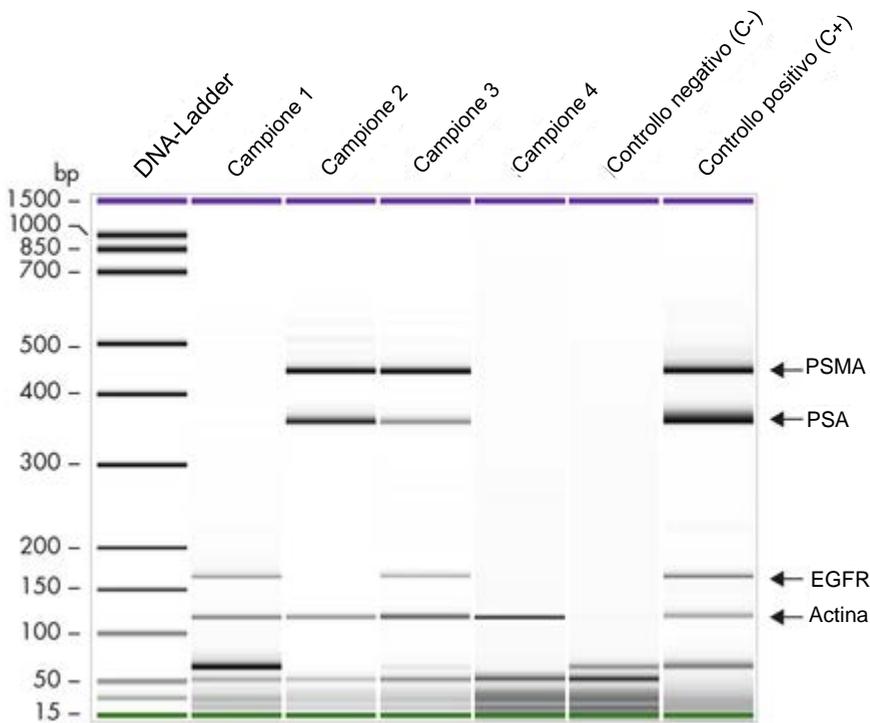


Figura 3. Risultati dei campioni di PCR Multiplex analizzati con AdnaTest ProstateCancerDetect su Agilent 2100 Bioanalyzer. La prima colonna mostra le dimensioni standard del DNA (DNA-Ladder). Il campione 1 è positivo per EGFR, il campione 2 è positivo per PSMA e PSA e il campione 3 è positivo per PSMA, PSA ed EGFR. Il campione 4 è negativo. L'actina è stata identificata nei campioni 1-4. Nelle ultime due colonne sono indicati il controllo negativo PCR (C-) e il controllo positivo (C+).

Analisi dei risultati per AdnaTest AR-Detect

Con l'uso di Agilent 2100 Bioanalyzer i picchi con una concentrazione $\geq 0,15$ ng/ μ l per AR sono positivi (Figura 4).

Il frammento di actina del gene di controllo deve essere rilevato in tutti i campioni dei pazienti (controllo PCR interno). Un segnale di actina costituisce un controllo positivo per la riuscita della separazione cellulare, della trascrizione inversa e della PCR Singleplex.

Nei campioni di controllo negativo e controllo RT non devono esserci bande di più di 80 coppie di basi (dimeri primer).

IMPORTANTE: Se il protocollo non viene seguito esattamente può determinare risultati falsi negativi o falsi positivi.

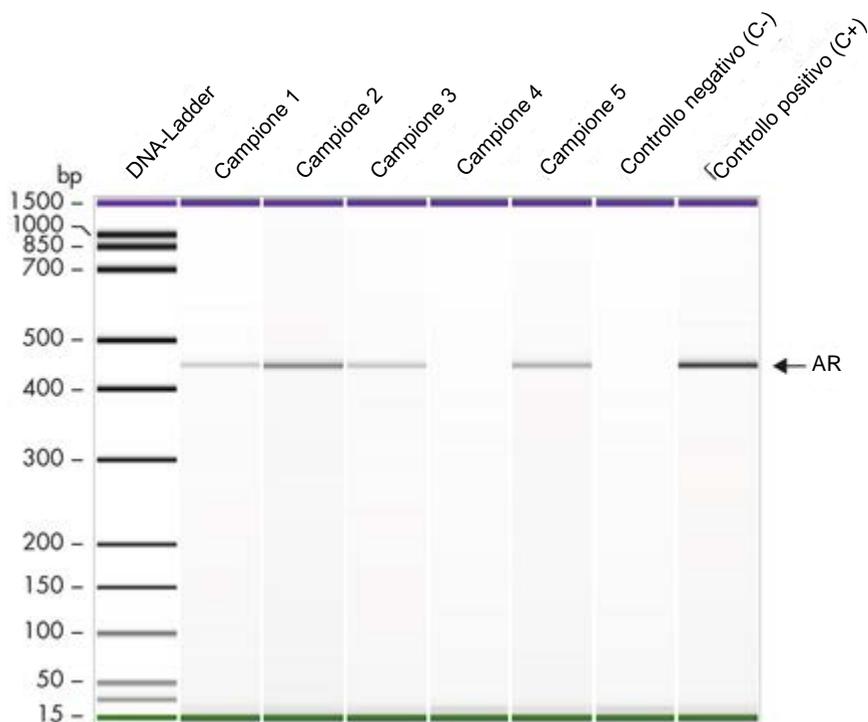


Figura 4. Risultati dei campioni di PCR Singleplex analizzati con AdnaTest ProstateCancerDetect. La prima colonna mostra le dimensioni standard del DNA (DNA-Ladder). I campioni 1-3 e il campione 5 sono positivi per AR. Il campione 4 è negativo. Nelle ultime due colonne sono indicati il controllo negativo PCR (C-) e il controllo positivo (C+).

Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni problematiche. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: **www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx**. Gli esperti del servizio di assistenza tecnica di QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante informazioni e protocolli presentati in questo manuale o le tecnologie per campioni e analisi (per le informazioni sui contatti visitare il sito **www.qiagen.com**).

Controllo di qualità

In conformità del sistema di gestione della qualità secondo le norme ISO di QIAGEN, ogni lotto di AdnaTest ProstateCancerSelect e AdnaTest ProstateCancerDetect viene testato rispetto a specifiche prestabilite per garantire la costante qualità del prodotto.

Limitazioni

L'uso di tutti i reagenti è riservato esclusivamente alla diagnostica in vitro.

L'utilizzo del prodotto è consentito soltanto a personale dotato delle necessarie conoscenze e competenze in merito alle procedure della diagnostica in vitro.

È importante che l'operatore legga attentamente le istruzioni per l'uso prima di utilizzare il sistema.

Per ottenere risultati ottimali della PCR è necessario attenersi rigorosamente al protocollo.

Controllare le date di scadenza dei singoli componenti, riportate sulla confezione e sulle etichette. Non utilizzare i componenti oltre la loro data di scadenza.

Eventuali risultati diagnostici generati dal sistema devono essere interpretati in combinazione con gli esiti di altri esami clinici o di laboratorio.

Caratteristiche prestazionali

Recupero

I campioni di sangue appartenenti a donatori sani sono stati arricchiti con 2 cellule LnCap di tumore della prostata, ottenute da coltura, al fine di determinare i tassi di recupero conseguiti dal test AdnaTest ProstateCancerSelect/Detect (Tabella 7).

Tabella 7. Tasso di recupero con AdnaTest ProstateCancer delle cellule tumorali aggiunte nei campioni di sangue di donatori sani

	Numero di positivi	Numero totale di campioni
Due cellule tumorali aggiunte in 5 ml di sangue	38 (95%)	40

Il tasso di recupero per la rilevazione di 2 cellule tumorali aggiunte in 5 ml di sangue di donatori sani è stato del 95%.

Specificità

AdnaTest ProstateCancerSelect/Detect è stato utilizzato per analizzare i campioni di 40 donatori sani e determinare la percentuale di falsi positivi al valore cut-off specificato (concentrazione del frammento di 0,10 ng/μl per ogni profilo del gene incluso, tranne l'actina).

Tabella 8. Determinazione della specificità

Controlli	Numero totale di campioni	Numero di falsi positivi	Specificità (%)
Donatori sani	40	0 (0%)	100

AdnaTest ProstateCancerSelect/Detect ha una specificità del 100% (Tabella 8).

Riproducibilità

Venti campioni di sangue appartenenti a donatori sani sono stati arricchiti con 10 cellule LnCap di tumore della prostata per ogni campione. I campioni di sangue sono stati analizzati da due operatori con il test AdnaTest ProstateCancerSelect/Detect per determinare la riproducibilità. La riproducibilità intra-saggio e inter-saggio è stata del 100% (Tabella 9).

Tabella 9. Riproducibilità del test AdnaTest ProstateCancer Select/Detect

Operatore	Risultati/campioni positivi per AdnaTest	Riproducibilità intra-saggio (%)	Riproducibilità inter-saggio (%)
A	10/10	100	100
B	10/10	100	100

Precisione

Per determinare la precisione sono stati creati dei pool di aliquote di cDNA, successivamente analizzati con AdnaTest ProstateCancerDetect. Due operatori hanno analizzato 30 campioni di cDNA, costituiti da 3 misurazioni indipendenti di 10 campioni. La precisione intra-saggio e inter-saggio è stata del 100% (Tabella 10).

Tabella 10. Precisione del test AdnaTest ProstateCancerDetect

Operatore	Risultati/campioni positivi per AdnaTest	Precisione intra-saggio (%)	Precisione inter-saggio (%)
A	30/30	100	100
B	30/30	100	100

Sostanze interferenti

Anticoagulanti

Durante il prelievo e il trasporto del sangue, è obbligatorio l'uso di anticoagulanti. Tuttavia l'eparina e il citrato causano la formazione di aggregati dopo l'aggiunta delle biglie immunomagnetiche AdnaTest, pertanto si ottiene un test senza risultati o con falsi risultati. Invece l'EDTA e l'ACDA (acido citrato destrosio soluzione A) sono compatibili con le biglie immunomagnetiche AdnaTest.

Emolisi

L'emolisi nei campioni di sangue (la frazione di plasma appare rossa) è, nella maggior parte dei casi, dovuta a condizioni inadeguate di trasporto e conservazione. I campioni emolitici possono produrre risultati falsi negativi e devono essere scartati.

Farmaci chemioterapici, terapie mirate e terapie antiormonali

I chemioterapici (taxani, cisplatino, oxaliplatino, 5-FU, antraciclina, irinotecan ecc.) sono potenti citotossine e possono danneggiare o causare la morte rapida delle cellule in un campione di sangue. La conseguenza è un'elevata probabilità di risultati falsi negativi con l'uso delle biglie immunomagnetiche AdnaTest. Dopo l'assunzione di queste sostanze, il corpo umano impiega 5–7 giorni per disintossicarsi (Tabella 11). I campioni di sangue prelevati in questo arco di tempo non devono essere utilizzati con le biglie immunomagnetiche AdnaTest.

Tabella 11. Emivita dei chemioterapici

Farmaco	Emivita	Riferimento
5-Fluorouracil	Fino a 20 minuti	www.drugs.com/pro/fluorouracil-injection.html
Docetaxel	Fino a 11,1 ore	www.drugs.com/pro/docetaxel.html
Cisplatino	Fino a 30 minuti	www.drugs.com/pro/cisplatin.html
Carboplatino	Fino a 5,9 ore	www.drugs.com/pro/carboplatin.html
Paclitaxel	Circa 25,4 ore	www.drugs.com/pro/paclitaxel.html

Le stesse precauzioni sono consigliate anche per le terapie farmacologiche mirate, ad esempio quelle basate sugli anticorpi (Herceptin®, bevacizumab, cetuximab ecc.), sugli inibitori tirosin-chinasi (olaparib, Iressa®, Erbitux®, lapatinib ecc.) e sui farmaci antiormonali (tamoxifene, abiraterone, enzalutamide ecc.) assunti da soli o contestualmente con i farmaci chemioterapici.

Nelle sperimentazioni cliniche che mirano a dimostrare il valore prognostico delle cellule tumorali circolanti (CTC) identificate e caratterizzate mediante l'uso delle biglie immunomagnetiche AdnaTest, non sono state osservate interferenze negative dei chemioterapici, delle terapie mirate o delle terapie antiormonali fintanto che è stato rispettato il periodo di attesa di almeno 7 giorni dalla somministrazione del farmaco. Inoltre l'impatto negativo dell'assunzione contestuale di farmaci d'uso comune (aspirina, ibuprofene, aprepitant, steroidi ecc.) è improbabile, ma viene comunque monitorato.

Condizioni interferenti

Coaguli nel sangue

Nell'ambito delle sperimentazioni cliniche è stato possibile osservare la formazione di coaguli nel sangue dopo l'incubazione con le biglie immunomagnetiche *AdnaTest*, con maggiore frequenza nei campioni di sangue di pazienti con patologia in stato avanzato. I campioni di sangue che presentano coaguli sono difficili da trattare e da pipettare durante il flusso di lavoro *AdnaTest*, a causa della maggiore viscosità. Contengono inoltre un numero esageratamente alto di leucociti contaminanti, che determinano risultati falsi positivi. Questi campioni devono essere scartati.

Patologie organiche benigne e malattie infiammatorie croniche

Le patologie organiche benigne e le infiammazioni croniche, ad esempio artrite, iperplasia prostatica benigna (BPH), morbo di Crohn, ecc., non determinano risultati falsi positivi per *AdnaTest*.

Allergia acuta

In condizioni di allergia acuta si assiste a un aumento del numero di leucociti contaminanti dopo l'arricchimento delle cellule CTC utilizzando le biglie immunomagnetiche *AdnaTest*. Di conseguenza non è possibile escludere del tutto i risultati falsi positivi.

Studi clinici

In totale 12 pazienti con carcinoma prostatico metastatico resistente alla castrazione (CRPC) sono stati seguiti durante la terapia con docetaxel. Un primo campione è stato analizzato all'inizio della terapia e altri 2 campioni sono stati analizzati nel periodo di follow-up.

Per quanto riguarda l'attivazione del recettore androgenico (AR), è stata chiaramente dimostrata la forte correlazione tra l'attivazione e la disattivazione dell'AR e il tasso di eliminazione delle cellule CTC dovuto all'intervento terapeutico. Tuttavia la percentuale di positività per CTC è scesa nel corso della terapia dal 70% iniziale al 35% circa nel periodo di follow-up, mentre la positività AR è scesa dal 55% all'11% circa. A causa della terapia, i subcloni CTC AR-positivi sono più sensibili alla terapia con docetaxel rispetto alle cellule CTC AR-negative. Questi risultati si correlano bene con quelli di Darshan et al. 2011, nei quali è stato osservato un blocco del trasporto nucleare e della segnalazione dell'AR indotto da taxani.

I risultati indicano un'identificazione specifica e sensibile delle cellule CTC nei campioni clinici di tumore della prostata e una valutazione dei profili genetici correlata ai target terapeutici.

Bibliografia

Darshan, M.S. et al. (2011) Taxane-Induced Blockade to Nuclear Accumulation of the Androgen Receptor Predicts Clinical Responses in Metastatic Prostate Cancer. *Cancer Res.* 2011 Sep 15; **71(18)**: 6019-6029. Pubblicazione online del 28 lug 2011 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1417.

Abbreviazioni

AdnaMag-L	Concentratore di particelle magnetiche (L = large, grande)
AdnaMag-S	Concentratore di particelle magnetiche (S = small, piccolo)
AR	Recettore androgenico
bp	Coppie di basi
C+	Controllo positivo
C-	Controllo negativo
cDNA	Acido deossiribonucleico complementare
DNA	Acido deossiribonucleico
dNTP	Deossinucleoside trifosfato
EGFR	Recettore del fattore di crescita epidermico
kb	chilobasi
mRNA	Acido ribonucleico messaggero
PCR	Reazione a catena della polimerasi
PSA	Antigene prostatico specifico
PSMA	Antigene prostatico specifico di membrana
RNasi	Ribonucleasi
rpm	Giri al minuto
RT	Trascrizione inversa

Simboli



Contenuto sufficiente per <N> test



Utilizzare entro



Limite di temperatura



Numero di catalogo



Consultare le istruzioni per l'uso



Fabbricante



Dispositivo medico-diagnostico in vitro



Numero di materiale



Global Trade Item Number

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Contenuto	N° cat.
AdnaTest ProstateCancerSelect	Per l'isolamento delle CTC e la successiva estrazione dell'mRNA da sangue intero umano per 12 preparazioni	395432
AdnaTest ProstateCancerDetect	Kit RT-PCR per la rilevazione dell'espressione genica associata al tumore della prostata nelle cellule tumorali arricchite	396432
Prodotti correlati		
AdnaTube	12 provette per campionamento contenenti EDTA. Utilizzare solo con sangue anticoagulato raccolto in provette BD per la raccolta del sangue in soluzione di A-CDA	399932
AdnaMag-L	Per 8 provette da 15 ml	399921
AdnaMag-S	Per 8 provette da 1,5 ml	399911
Sensiscript RT Kit (50)	Per 50 reazioni di trascrizione inversa:* Sensiscript Reverse Transcriptase, 150 µl 10x tampone RT, 100 µl di miscela di dNTP (contiene 5 mM di ciascun dNTP), 1,1 ml di acqua priva di RNasi	205211
HotStarTaq Master Mix Kit (250 U)	3 x 0,85 ml HotStarTaq Master Mix (contiene 250 unità di HotStarTaq DNA polimerasi, tampone PCR con 3 mM di MgCl ₂ , e 400 µM di ogni dNTP) e 2 x 1,7 ml di acqua priva di RNasi	203443

* il Sensiscript RT Kit (50) è sufficiente per 25 campioni soltanto con l'uso di AdnaTest ProstateCancerDetect perché per ogni reazione occorre un volume doppio.

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito **www.qiagen.com** oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza QIAGEN o al distributore locale.

Contratto di licenza limitata per AdnaTest ProstateCancerSelect e AdnaTest ProstateCancerDetect

L'uso di questo prodotto implica l'accettazione da parte dell'acquirente o dell'utente del prodotto dei seguenti termini:

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al relativo manuale e soltanto con i componenti contenuti nel rispettivo Kit. QIAGEN non concede nessuna licenza, nell'ambito di qualunque sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo kit con qualsiasi componente non incluso in questo kit, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, il presente manuale e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com. Alcuni di questi protocolli aggiuntivi sono stati messi a punto da utenti QIAGEN a beneficio degli utenti QIAGEN. Si tratta di protocolli che non sono stati collaudati o ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non offre nessuna garanzia in merito alla violazione di eventuali diritti di terzi.
2. A parte le licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non fornisce nessuna garanzia che questo kit e/o l'uso o gli usi dello stesso non costituiscano violazione dei diritti di terzi.
3. Questo kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per un solo utilizzo e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del kit acconsentono a non intraprendere e a non permettere a nessun altro di intraprendere qualsiasi iniziativa che possa determinare o agevolare qualunque azione di cui si fa divieto sopra. QIAGEN potrà far valere i divieti di cui al presente Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutti i costi sostenuti a scopo di indagine e delle spese di giudizio, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo kit e/o ai relativi componenti.

Per le condizioni di licenza aggiornate, consultare il sito www.qiagen.com.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, HotStarTaq®, Sensiscript® (QIAGEN Group); Agilent® (Agilent Technologies, Inc.); ERBITUX® (ImClone LLC., una società interamente controllata da Eli Lilly and Company); Herceptin® (Genentech, Inc.); IRESSA® (AstraZeneca Group) LabChip® (Caliper Life Sciences, Inc.); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.); Vacutainer® (Becton Dickinson and Company).

HB-2396-001 © 2017 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

Ordini www.qiagen.com/shop | Assistenza tecnica support.qiagen.com | Sito web www.qiagen.com