

Marzo 2017

Manuale AdnaTest OvarianCancerSelect e OvarianCancerDetect



12 (n° di catalogo 395442)



12 (n° di catalogo 396442)

Per arricchimento di cellule tumorali dal sangue intero di pazienti con tumore dell'ovaio e rilevazione dell'espressione genica associata a tale tumore nelle cellule tumorali arricchite

Per uso diagnostico in vitro

Versione 1

IVD

CE

REF

395442 (AdnaTest OvarianCancerSelect)

396442 (AdnaTest OvarianCancerDetect)



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
GERMANIA

R1 **MAT**

1106498IT

Sample to Insight



Indice

Uso previsto	4
Riassunto e spiegazione	4
Principio della procedura	5
AdnaTest OvarianCancerSelect.....	5
AdnaTest OvarianCancerDetect	6
Materiali in dotazione.....	7
Contenuto del kit.....	7
Materiale necessario ma non fornito	9
AdnaTest OvarianCancerSelect.....	9
AdnaTest OvarianCancerDetect	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 OvarianCancerSelect..	14
Protocollo: Rilevazione dell'espressione genica associata al tumore dell'ovaio nelle cellule tumorali arricchite con l'uso di AdnaTest OvarianCancerSelect	17

Protocollo: PCR Multiplex e Duplex	22
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	31
Riproducibilità.....	32
Precisione.....	32
Sostanze interferenti	33
Condizioni interferenti.....	35
Studi clinici.....	35
Abbreviazioni	36
Simboli.....	37
Informazioni per gli ordini	38

Uso previsto

AdnaTest OvarianCancerSelect è un metodo diagnostico in vitro destinato all'arricchimento immunochimico di cellule tumorali circolanti da campioni di sangue intero anticoagulato ottenuti da pazienti con tumore dell'ovaio attraverso una combinazione di antigeni epiteliali e associati al tumore.

AdnaTest OvarianCancerDetect 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 OvarianCancerSelect/Detect non è destinato a finalità di screening e all'utilizzo come test diagnostico per confermare la presenza di tumore all'ovaio.

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

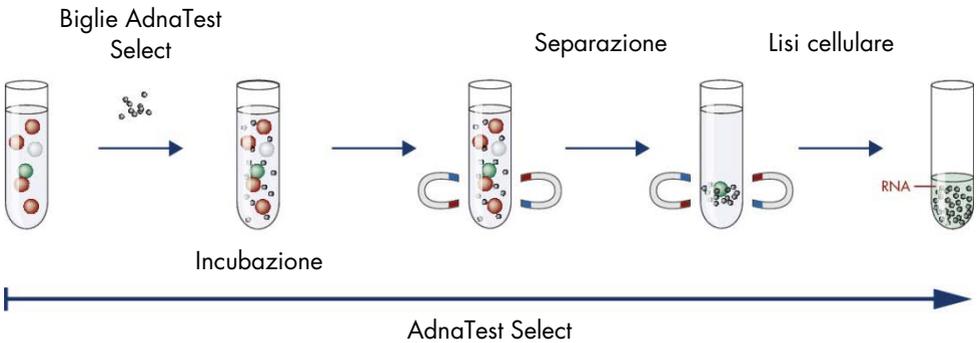
Riassunto e spiegazione

AdnaTest OvarianCancerSelect consente l'arricchimento immunomagnetico delle cellule tumorali tramite antigeni epiteliali e associati al tumore. AdnaTest OvarianCancerDetect è utilizzato per analizzare, tramite trascrizione inversa e PCR, l'espressione genica associata al tumore dell'ovaio in cellule tumorali arricchite immunomagneticamente.

Principio della procedura

AdnaTest OvarianCancerSelect

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 (Figure 1 e 2).



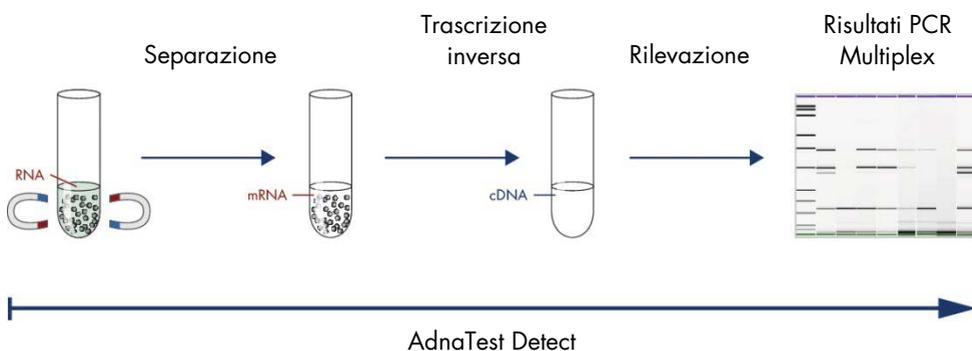
- ○ Cellule ematiche ● Cellule tumorali
- ⊛ Biglie magnetiche rivestite di anticorpi o Oligo(dT)25

Figura 1. AdnaTest OvarianCancerSelect: selezione immunomagnetica delle cellule con anticorpi associati a tumore multiplo.

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

AdnaTest OvarianCancerDetect

AdnaTest OvarianCancerDetect 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 stampo per la rilevazione delle cellule tumorali e la caratterizzazione mediante PCR multiplex/duplex. La Miscela di primer OvarianDetect AdnaTest consente l'amplificazione di tre antigeni associati al tumore e di un gene di controllo. La Miscela di primer ERCC1-Detect AdnaTest amplifica il gene di escissione riparativa complementare incrociata 1 (ERCC1) e un gene di controllo.



- ○ Cellule ematiche ● Cellule tumorali
- ⊗ Biglie magnetiche rivestite di anticorpi o Oligo(dT)₂₅

Figura 2. AdnaTest OvarianCancerDetect: 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 miscele dei due primer generano frammenti delle dimensioni seguenti:

Miscela di primer OvarianDetect

- CA125: 432 bp
- GA733-2: 395 bp

- Muc-1: 299 bp
- Actina: 120 bp (controllo PCR interno)

Miscela di primer ERCC1-Detect

- ERCC1: 357 bp
- Actina: 120 bp (controllo PCR interno)

Nota: le dimensioni dei frammenti possono variare leggermente. Accertarsi di utilizzare il Controllo positivo Ovarian AdnaTest e il Controllo positivo ERCC1 AdnaTest per l'assegnazione dei segnali rilevati.

Materiali in dotazione

Contenuto del kit

AdnaTest OvarianCancerSelect			
Numero di catalogo		395442	
Numero di test		12	
Provette di raccolta	Collection Tubes (Provette di raccolta) (15 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	3 × 5
Provette di raccolta	Collection Tubes (Provette di raccolta) (1,5 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	24
Rosso	OvarianSelect Beads (Biglie OvarianSelect)	OSB	1,2 ml
Rosso	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (Tampone di legame/lisi AdnaTest)	LBB	2 x 1,2 ml
	Manuale		1

AdnaTest OvarianCancerDetect			
Numero di catalogo		396442	
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	4 ml
Viola	Tris-HCL Buffer (Tampone Tris-HCL)	TBC	2 ml
AdnaTest OvarianCancerDetect			Confezione 2
Blu	AdnaTest PrimerMix OvarianDetect (Miscela di primer OvarianDetect AdnaTest)	PMO	144 µl
Arancione	AdnaTest Positive Control Ovarian (C+) (Controllo positivo Ovarian AdnaTest (C+))	CONTROL +	56 µl
Blu	AdnaTest PrimerMix ERCC1-Detect (Miscela di primer ERCC1-Detect AdnaTest)	PME	144 µl
Arancione	AdnaTest Positive Control ERCC1 (C+) (Controllo positivo ERCC1 AdnaTest (C+))	CONTROL +	56 µl
Manuale			1

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

Materiale necessario ma non fornito

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 OvarianCancerSelect

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

- AdnaTubes (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 OvarianCancerDetect

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 (50°C)
- Termociclatore con coperchio riscaldato e velocità di riscaldamento di 2°C/secondo.
- 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, 2,500 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 protettivi. 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 campioni e materiali di scarto nel rispetto delle procedure di sicurezza locali.

Informazioni per l'uso

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

Brevetti

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

Conservazione e manipolazione dei reagenti

Conservazione

Il sistema AdnaTest OvarianCancer viene fornito in tre confezioni. Conservare AdnaTest OvarianCancerSelect (n. cat. 395442) e AdnaTest RNA Reagent Box 1 (confezione 1 di n. cat. 396442) a 2–8°C. Non utilizzare nessun componente oltre la data di scadenza.

Conservare separatamente AdnaTest OvarianCancerDetect Box 2 (confezione 2 di n. cat. 396442), 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 OvarianSelect 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 OvarianCancerSelect", pagina 14.)
- Tutti i componenti e i reagenti supplementari procurati da altri fornitori devono essere conservati secondo le rispettive istruzioni. Sono valide le indicazioni sulla sicurezza fornite dai rispettivi produttori.
- Indossare guanti di protezione per evitare la contaminazione con DNA, RNA e RNasi.
- Aliquotare le Biglie OvarianSelect 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.
- Devono essere osservate 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 OvarianCancerSelect 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 AdnaTube, n. cat. 399932.
- Conservare immediatamente il sangue a 4°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 OvarianCancerSelect

Punti 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 OvarianSelect prima dell'uso, come descritto di seguito in "Procedura A: Preparazione delle Biglie OvarianSelect".
- 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 i reagenti a temperatura ambiente e miscelarli fino al completo scioglimento del precipitato.

Procedura A: Preparazione delle Biglie OvarianSelect

1. Risospendere con cura le Biglie OvarianSelect pipettando; non agitare in vortex!
2. Calcolare il volume delle Biglie OvarianSelect 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.

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

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

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 "Procedura B: selezione delle cellule tumorali", più sotto.

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 (in dotazione).
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 OvarianSelect (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 ciascun sopranatante (lisato cellulare) in una nuova provetta 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 dell'ovaio nelle cellule tumorali arricchite con l'uso di AdnaTest OvarianCancerSelect", pag. 17) o conservare i lisati cellulari a -20°C per non più di 2 settimane.

Protocollo: Rilevazione dell'espressione genica associata al tumore dell'ovaio nelle cellule tumorali arricchite con l'uso di AdnaTest OvarianCancerSelect

Punti 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 termostato 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.
- Scongela 10x tampone RT e dNTP, dal Sensiscript RT Kit, a temperatura ambiente. Miscelare in vortex. Centrifugare brevemente e conservare su ghiaccio. Scongela l'acqua priva di RNasi (inclusa nel Sensiscript RT Kit).
- Regolare un blocco termico o un bagnomaria a 50°C.

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

1. Risospendere con cura le Biglie Oligo (dT)₂₅ pipettando. 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. 18) 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. 18). Procedere con "Procedura B: estrazione dell'mRNA".

Procedura B: estrazione dell'mRNA

1. Aggiungere 20 µl di Biglie Oligo(dT)₂₅ (passaggio 6, più sopra) 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 sopranatante 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 sopranatante.
 - 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 sopranatante. Questo passaggio deve essere eseguito con delicatezza (attenzione al pellet) poiché le biglie potrebbero scivolare e 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 sopranatante.
11. Rimuovere la guida magnetica dall'AdnaMag-S.
12. Risospendere il complesso mRNA/biglia in 29,5 µl di acqua priva di RNasi.

13. Trasferire le provette in un blocco termico o bagnomaria e incubare per 5 minuti a 50°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 10,5 µl per ogni reazione nelle provette per PCR da 0,2 ml.
3. Risospendere con delicatezza i complessi mRNA/biglie (passaggio 10, pag. 19) 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 tampone RT	4,0 µl
Miscela di dNTP (5 mM di ciascun dNTP)	4,0 µl
Inibitore della RNasi, 40 U/µl (Promega)	0,5 µl
Sensiscript trascrittasi inversa (SRT)	2,0 µl
Templato RNA*	29,5 µl
complesso mRNA/biglia o acqua priva di RNasi	
Volume totale	40,0 µl

* come controllo RT aggiungere 29,5 µl di acqua priva di RNasi al posto del complesso mRNA/biglia. Il volume del composto mRNA/biglia potrebbe variare leggermente. Usare sempre il volume totale del composto nella reazione di trascrizione inversa.

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

Tabella 2. Programma trascrizione inversa

Fase	Durata	Temperatura
Trascrizione inversa	60 minuti	37°C
Denaturazione	5 minuti	93°C
Raffreddamento	∞	4°C

5. Collocare le provette di reazione con il cDNA su ghiaccio o conservare a -20°C per 4 settimane al massimo.
6. Proseguire con "Protocollo: PCR Multiplex e Duplex", pag. 22.

Protocollo: PCR Multiplex e Duplex

Punti 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

- Scongelare il kit HotStarTaq Master Mix (QIAGEN), la Miscela di primer OvarianDetect AdnaTest, la Miscela di primer ERCC1-Detect Adna Test, il Controllo positivo Ovarian AdnaTest, il Controllo positivo ERCC1 AdnaTest e acqua priva di RNasi. Agitare, centrifugare brevemente e conservare su ghiaccio.

Procedura A: PCR Multiplex (AdnaTest OvarianDetect)

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

Il volume della soluzione Master Mix deve essere calcolato aggiungendo un 10% in più al volume necessario per il numero dei campioni. Ricordarsi di includere sempre un Controllo positivo Ovarian AdnaTest, acqua priva di RNasi come controllo negativo e il controllo RT.

2. Per ogni preparazione dispensare 42,0 µl della soluzione PCR Master Mix nelle provette di reazione per PCR da 0,2 ml. Risospendere la miscela cDNA/biglia pipettandola e aggiungendone 8,0 µl in ogni provetta di reazione.

Nota: come controllo negativo aggiungere 8,0 µl 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	25,0 µl
Acqua priva di RNasi	13,0 µl
Miscela di primer OvarianDetect AdnaTest	4,0 µl
cDNA oppure controllo RT oppure controllo negativo (acqua priva di RNasi) oppure Controllo positivo Ovarian AdnaTest, ciascuno:	8,0 µl
Volume totale	50,0 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 37 cicli in totale.

Tabella 4. Programma di ciclaggio PCR

Fase	Durata	Temperatura
Fase di attivazione iniziale	15 minuti	95°C
Ciclaggio a 3 fasi		
Denaturazione	30 secondi	94°C
Appaiamento	30 secondi	58°C
Estensione	30 secondi	72°C
Estensione finale	10 minuti	72°C
Raffreddamento	∞	12°C

Procedura B: PCR Duplex (Adna Test ERCC1-Detect)

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

Il volume della soluzione Master Mix deve essere calcolato aggiungendo un 10% in più al volume necessario per il numero dei campioni. Ricordarsi di includere sempre un Controllo positivo ERCC1 AdnaTest, acqua priva di RNasi come controllo negativo e il controllo RT.

2. Per ogni preparazione dispensare 42,0 µl della soluzione Master Mix nelle provette di reazione per PCR da 0,2 ml. Risospendere la miscela cDNA/biglia pipettandola e aggiungendone 8,0 µl in ogni provetta di reazione.

Nota: come controllo negativo aggiungere 8,0 µl di acqua priva di RNasi al posto del cDNA.

Tabella 5. Preparazione della miscela PCR Duplex

Componente	Volume
PCR Duplex Master Mix	
HotStarTaq Master Mix	25,0 µl
Acqua priva di RNasi	13,0 µl
Miscela di primer ERCC1-Detect AdnaTest	4,0 µl
cDNA oppure controllo RT oppure controllo negativo (acqua priva di RNasi) oppure Controllo positivo ERCC1 AdnaTest, ciascuno:	8,0 µl
Volume totale	50,0 µl

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

Tabella 6. Programma di ciclaggio PCR

Fase	Durata	Temperatura
Fase di attivazione iniziale	15 minuti	95°C
Ciclaggio a 3 fasi		
Denaturazione	30 secondi	94°C
Appaiamento	30 secondi	60°C
Estensione	60 secondi	72°C
Estensione finale	10 minuti	72°C
Raffreddamento	∞	12°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 falsi.

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**" (Contesti) 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 OvarianDetect

Il test è da considerarsi positivo se viene rilevato chiaramente un frammento della PCR di almeno un trascritto associato al tumore (GA733-2, Muc-1 o CA125).

Con l'uso di Agilent 2100 Bioanalyzer i picchi con una concentrazione $\geq 0,15$ ng/ μ l sono positivi (Figura 3).

Il frammento di actina del gene di controllo deve essere rilevato in tutti i campioni di test (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 di oltre 1000 bp indica contaminazione con DNA genomico, suggerendo un possibile problema durante la separazione cellulare. In tal caso, i risultati non sono validi.

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

Non esitare a contattare il personale dell'assistenza se serve aiuto per interpretare i risultati.

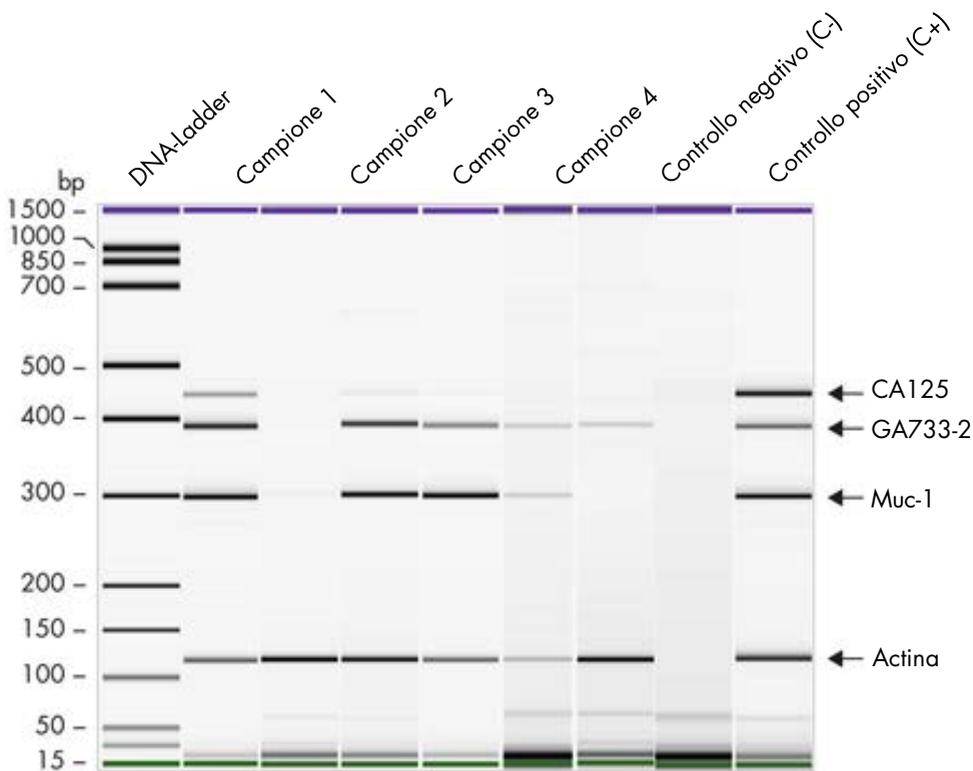


Figura 3. Risultati dei campioni di PCR Multiplex analizzati con AdnaTest OvarianCancerDetect su Agilent 2100 Bioanalyzer. La prima colonna mostra le dimensioni standard del DNA (DNA-Ladder). Il campione 1 è positivo per GA733-2, Muc-1 e CA125; i campioni 3, 4 e 5 sono positivi per GA733-2 e Muc-1, mentre il campione 6 è positivo per GA733-2. Il campione 2 è negativo. L'actina è stata identificata nei campioni 1-6. Nelle ultime due colonne sono indicati il controllo PCR negativo e il controllo PCR positivo.

Analisi dei risultati per AdnaTest ERCC1-Detect

Con l'uso di Agilent 2100 Bioanalyzer i picchi con una concentrazione $\geq 0,2$ ng/ μ l per ERCC1 sono positivi (Figura 4).

Il frammento di actina del gene di controllo deve essere rilevato in tutti i campioni di test (controllo PCR interno). Un segnale di actina costituisce un controllo positivo per la riuscita

della separazione cellulare, della trascrizione inversa e della PCR Duplex. 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.

Non esitare a contattare il personale dell'assistenza se serve aiuto per interpretare i risultati.

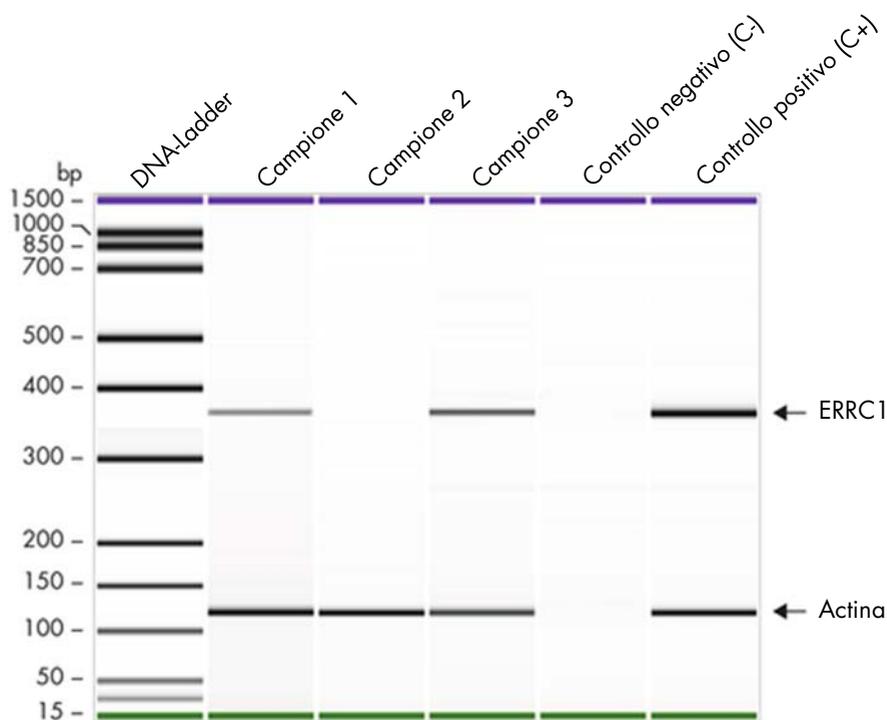


Figura 4. Risultati dei campioni di PCR Duplex analizzati con AdnaTest OvarianCancerDetect. La prima colonna mostra le dimensioni standard del DNA (DNA-Ladder). I campioni 1 e 3 sono positivi per ERCC1. Il campione 2 è negativo. L'actina è stata identificata nei campioni 1-3. Nelle ultime due colonne sono indicati il controllo PCR negativo e il controllo PCR positivo (ERCC1).

Guida alla risoluzione dei problemi

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 OvarianCancerSelect e AdnaTest OvarianCancerDetect 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 e 5 cellule Igrov1 di tumore dell'ovaio, ottenute da coltura, al fine di determinare i tassi di recupero conseguiti dal test AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect (Tabella 7).

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

	Numero totale di campioni	Numero di positivi	Recupero
Due cellule tumorali aggiunte in 5 ml di sangue	20	18	90%
Cinque cellule tumorali aggiunte in 5 ml di sangue	20	20	100%

Il tasso di recupero per la rilevazione di 2 cellule tumorali aggiunte in 5 ml di sangue di donatori sani è stato del 90%. La rilevazione di 5 cellule aggiunte in 5 ml di sangue di donatori sani è stata del 100%.

Specificità

AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect è stato utilizzato per analizzare i campioni di 20 donatori sani e determinare la percentuale di falsi positivi al valore cut-off specificato (concentrazione del frammento di 0,15 ng/μl per ogni gene analizzato, tranne l'actina). AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect ha una specificità del 95% (Tabella 8).

Tabella 8. Determinazione delle specifiche

Controlli	Numero totale di campioni	Numero di falsi positivi	Specificità (%)
Donatori sani	20	1 (5%)	95

Riproducibilità

Venti campioni di sangue appartenenti a donatori sani sono stati arricchiti con 10 cellule Igrov1 di tumore dell'ovaio per ogni campione. I campioni di sangue sono stati analizzati da due operatori con AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect per determinare la riproducibilità. La riproducibilità intra-saggio e inter-saggio è stata del 100% (Tabella 9).

Tabella 9. Riproducibilità di AdnaTest OvarianCancer 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 OvarianCancerDetect. 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 di AdnaTest OvarianCancerDetect

Operatore	Risultati/campioni positivi per AdnaTest	Riproducibilità intra-saggio (%)	Riproducibilità 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-chinasici (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. È inoltre improbabile un impatto negativo dell'assunzione contestuale di farmaci d'uso comune (aspirina, ibuprofene, aprepitant, steroidi ecc.), che 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 l'artrite, il 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

I risultati di una sperimentazione clinica eseguita con AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect sono stati pubblicati sulla rivista scientifica *Clinical Chemistry* nell'ottobre del 2014. Questo kit di test per il tumore dell'ovaio utilizza le biglie magnetiche marcate con anti-EpCAM e anti-MUC1 per l'arricchimento delle cellule CTC e, successivamente, esegue l'analisi RT-PCR della sovraespressione di *EpCAM*, *MUC1*, *CA125* ed *ERCC1*. In questo studio erano disponibili i campioni di sangue di 147 pazienti con diagnosi primaria. Le cellule CTC sono state rilevate nel 14% delle pazienti e sono state significative predittrici della sopravvivenza globale (Overall Survival, OS: $p = 0,041$). Inoltre le cellule CTC ERCC1-positive, rilevate

nell'8% delle pazienti, presentavano una correlazione significativa con la sopravvivenza libera da progressione di malattia (Disease-Free Survival, DFS: $p = 0,009$) e la sopravvivenza globale (OS: $p = 0,026$). L'importanza di questo studio sta nell'aver dimostrato chiaramente che le cellule CTC ERCC1-positive sono un predittore indipendente della resistenza alle terapie con platino ($p = 0,01$). Sorprendentemente questa correlazione è stata trovata soltanto per la caratterizzazione molecolare delle CTC con AdnaTest, ma non per la colorazione dei tessuti IHC (paraffina) utilizzando l'anticorpo 8F1 che viene normalmente utilizzato per identificare l'ERCC1 nei tessuti.

Bibliografia

Kuhlmann, J.D. et al. (2014) ERCC1-Positive Tumor Cells in the Blood of Ovarian Cancer Patients as a Predictive Biomarker for Platinum Resistance. *Clin. Chem.* **60**, 1282–9.

Abbreviazioni

AdnaMag-L	Concentratore di particelle magnetiche (L = large, grande)
AdnaMag-S	Concentratore di particelle magnetiche (S = small, piccolo)
bp	Coppie di basi
C+	Controllo positivo
C-	Controllo negativo
CA125	Antigene tumorale 125
cDNA	Acido deossiribonucleico complementare
DNA	Acido deossiribonucleico
dNTP	Deossinucleoside trifosfato
ERCC1	Escissione riparativa complementare incrociata 1
GA733-2	Antigene 733-2 associato al tumore gastrointestinale
kb	chilobasi
mRNA	Acido ribonucleico messaggero
Muc-1	Gene Muc-1
PCR	Reazione a catena della polimerasi
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 OvarianCancerSelect	Per l'isolamento delle CTC e la successiva estrazione dell'mRNA da sangue intero umano per 12 preparazioni	395442
AdnaTest OvarianCancerDetect	Kit RT-PCR per la rilevazione dell'espressione genica associata al tumore dell'ovaio nelle cellule tumorali arricchite	396442
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 kit Sensiscript RT (50) è sufficiente per 25 campioni soltanto con l'uso di AdnaTest OvarianCancerDetect perché per ogni reazione occorre un volume doppio.

Per le informazioni aggiornate sulla licenza e le clausole di esclusione della responsabilità per i singoli prodotti, consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN specifico. 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 OvarianCancerSelect e AdnaTest OvarianCancerDetect

L'utilizzo di questo prodotto comporta per l'acquirente o l'utente del prodotto l'accettazione 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 della 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 farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, 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 i termini di licenza aggiornati, visitare 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-2344-001 © 2017 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

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