

März 2017

# AdnaTest ProstateCancerSelect und ProstateCancerDetect Handbuch



12 (Katalognummer 395432)



12 (Katalognummer 396432)

Zur Anreicherung von Tumorzellen aus dem Vollblut von Prostatakrebspatienten und zum Nachweis von Prostatakrebs-assoziiierter Genexpression in angereicherten Tumorzellen  
Für in-vitro-diagnostische Anwendungen  
Version 1



395432 (AdnaTest ProstateCancerSelect)  
396432 (AdnaTest ProstateCancerDetect)



QIAGEN GmbH, QIAGEN Straße 1, 40724 Hilden, DEUTSCHLAND



1106692DE



# Inhaltsverzeichnis

Verwendungszweck .....	4
Zusammenfassung und Erläuterung .....	4
Verfahrensprinzip .....	5
AdnaTest ProstateCancerSelect .....	5
AdnaTest ProstateCancerDetect .....	6
Mitgelieferte Materialien.....	7
Kit-Inhalt .....	7
Erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien .....	9
AdnaTest ProstateCancerSelect .....	9
AdnaTest ProstateCancerDetect .....	10
Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen .....	11
Sicherheitshinweise.....	11
Informationen zur Anwendung .....	11
Patente.....	11
Lagerung und Handhabung der Reagenzien .....	12
Lagerung.....	12
Handhabung .....	12
Lagerung und Handhabung der Proben.....	14
Probenvorbereitung .....	14
Protokoll: Anreicherung von Tumorzellen mit dem AdnaTest ProstateCancerSelect .....	15
Protokoll: Nachweis von Prostatakrebs-assoziiierter Genexpression in angereicherten Tumorzellen mit dem AdnaTest ProstateCancerDetect .....	19

---

Protokoll: Multiplex- und Singleplex-PCR .....	24
Interpretation der Ergebnisse .....	27
Fragmentanalyse mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer .....	27
Hilfe zur Fehlerbehebung .....	31
Qualitätskontrolle .....	31
Anwendungseinschränkungen .....	31
Leistungsmerkmale .....	32
Wiederfindung .....	32
Spezifität .....	32
Reproduzierbarkeit .....	33
Präzision .....	33
Störsubstanzen .....	34
Störende Umstände .....	35
Klinische Studien .....	36
Literatur .....	37
Abkürzungen .....	37
Symbole .....	38
Bestellinformationen .....	39

---

# Verwendungszweck

Der AdnaTest ProstateCancerSelect ist eine Methode der In-vitro-Diagnostik zur immunochemischen Anreicherung von zirkulierenden Tumorzellen aus antikoagulierten Vollblutproben von Prostatakrebspatienten über eine Kombination von epithelialen und tumorassoziierten Antigenen.

Der AdnaTest ProstateCancerDetect ist ein Test für die In-vitro-Diagnostik zur Analyse der Expressionsprofile von Tumorzellen durch reverse Transkription und Multiplex-PCR mit anschließender densitometrischer Analyse der PCR-Produkte mittels automatisierter Kapillarelektrophorese unter Verwendung des Agilent® 2100 Bioanalyzer.

Der AdnaTest ProstateCancerSelect/Detect ist nicht für Screening-Zwecke vorgesehen und darf nicht als diagnostischer Test zur Bestätigung des Vorhandenseins eines Prostatakarzinoms verwendet werden.

Das Produkt darf nur von sachkundigen Personen, z. B. technischen Angestellten und Ärzten, die in der Anwendung molekularbiologischer Techniken geschult sind, verwendet werden.

## Zusammenfassung und Erläuterung

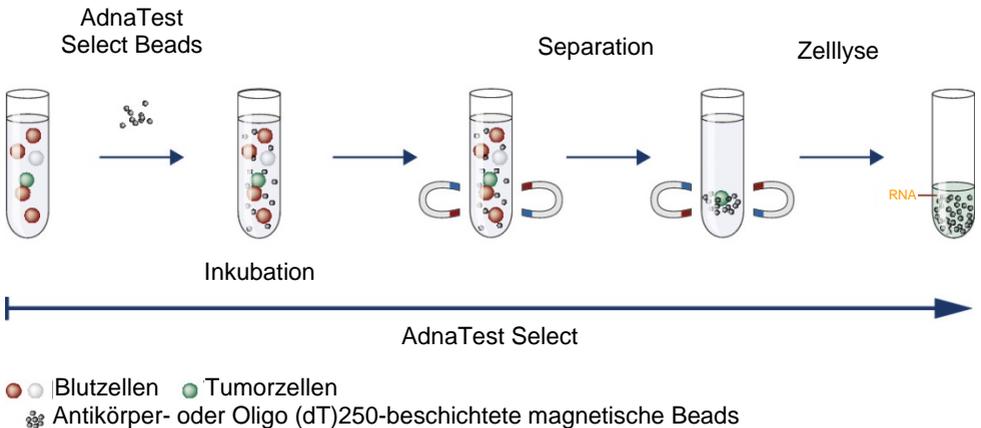
Der AdnaTest ProstateCancerSelect ermöglicht die immunomagnetische Anreicherung von Tumorzellen über epitheliale und tumorassoziierte Antigene. Der AdnaTest ProstateCancerDetect dient der Analyse von Prostatakrebs-assoziiierter Genexpression in immunomagnetisch angereicherten Tumorzellen durch reverse Transkription und PCR.

# Verfahrensprinzip

## AdnaTest ProstateCancerSelect

Antikörper gegen epitheliale und tumorassoziierte Antigene werden zur Markierung von Tumorzellen in Vollblut mit Magnetpartikeln (Beads) konjugiert. Die markierten Zellen werden mit einem Magnetpartikelkonzentrator (AdnaMag-L und AdnaMag-S) extrahiert und anschließend lysiert (Abbildung 1).

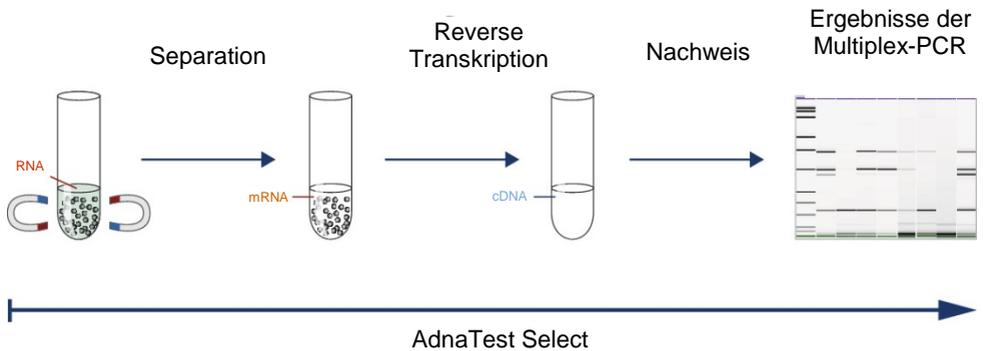
Das Zellysate wird für die weitere Analyse mit dem AdnaTest ProstateCancerDetect verwendet.



**Abbildung 1. AdnaTest ProstateCancerSelect: Immunomagnetische Zellselektion mit mehreren tumorassoziierten Antikörpern.** Im ersten Schritt werden die im Blut zirkulierenden Tumorzellen (circulating blood cells, CTC) angereichert (AdnaTest Select). Dazu werden Antikörper-beschichtete Magnetpartikel (Beads) verwendet. Es werden mehrere Antikörper verwendet, die mit hoher Spezifität und Affinität an die entsprechenden Krebszellen binden. Die angereicherten Zellen werden lysiert und anschließend mehrere Male gereinigt, um mRNA zu extrahieren.

## AdnaTest ProstateCancerDetect

Der AdnaTest ProstateCancerDetect enthält Oligo (dT)<sub>25</sub>-Beads zur Isolierung von mRNA aus dem Lysat der zuvor angereicherten Tumorzellen. Nach reverser Transkription wird cDNA erhalten, die anschließend als Vorlage für den Nachweis und die Charakterisierung von Tumorzellen mittels Multiplex-PCR dient. Das AdnaTest PrimerMix ProstateDetect ermöglicht die Amplifizierung von drei tumorassoziierten Antigenen und einem Kontrollgen. Das AdnaTest PrimerMix AR-Detect ermöglicht die Amplifikation des Androgenrezeptors (AR).



- Blutzellen
- Tumorzellen
- ⊗ Antikörper- oder Oligo (dT)<sub>250</sub>-beschichtete magnetische Beads

**Abbildung 2. AdnaTest ProstateCancerDetect: Multiplex-PCR unterschiedlicher krebsassoziierter Tumormarker.** In einem zweiten Schritt werden die angereicherten Zellen mittels RT-PCR auf tumorassoziierte Expressionsmuster geprüft. Aus den mRNA-Strängen wird durch reverse Transkription cDNA hergestellt. Anschließend können mehrere assoziierte Tumormarker mittels Multiplex-PCR amplifiziert und visualisiert werden.

Die beiden AdnaTest PrimerMixes erzeugen folgende Fragmente:

#### PrimerMix ProstateDetect

- PSMA: 449 BP
- PSA: 357 BP
- EGFR: 163 BP
- Aktin: 120 BP (interne PCR-Kontrolle)

#### PrimerMix AR-Detect

- AR: 440 BP

**Hinweis:** Die Größe der Fragmente kann leicht variieren. Für die Zuordnung der detektierten Signale sind die AdnaTest Positivkontrollen zu verwenden.

## Mitgelieferte Materialien

### Kit-Inhalt

<b>AdnaTest ProstateCancerSelect</b>			
<b>Anzahl Tests</b>			<b>12</b>
<b>Katalognummer</b>			<b>395432</b>
Entnahmeröhrchen	Collection Tubes (Entnahmeröhrchen) (1,5 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	3 x 5
Entnahmeröhrchen	Collection Tubes (Entnahmeröhrchen) (1,5 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	24
Rot	ProstateSelect Beads	PSB	1,2 ml
Rot	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (Lyse- /Bindungspuffer)	LBB	2 x 1,2 ml
	Handbuch		1

<b>AdnaTest ProstateCancerDetect</b>			
<b>Katalognr.</b>	<b>396432</b>		
<b>Anzahl Tests</b>	<b>12</b>		
<b>AdnaTest RNA-Reagenzien</b>			<b>Packung 1</b>
Rot	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (Lyse-/Bindungspuffer)	LBB	2 ml
Orange	Oligo(dT)25 Beads	OdT	280 µl
Weiß	RNA Purification Buffer A (RNA-Reinigungspuffer A)	BA	4 ml
Weiß	RNA Purification Buffer B (RNA-Reinigungspuffer B)	BB	4 ml
Lila	Tris-HCL Buffer (Tris-HCL-Puffer)	TB	2 ml
<b>AdnaTest ProstateCancerDetect</b>			<b>Packung 2</b>
Blau	AdnaTest PrimerMix ProstateDetect	PMP	144 µl
Orange	AdnaTest Positive Control (Positivkontrolle) Prostate (C+)	<b>CONTROL +</b>	40 µl
Gelb	AdnaTest PrimerMix AR-Detect	PMA	144 µl
Rosa	AdnaTest Positive Control (Positivkontrolle) AR (C+)	<b>CONTROL +</b>	40 µl
	Handbuch		1

Die Reagenzien des AdnaTest ProstateCancerDetect reichen für die Analyse von 6 PCR-Kontrollen und 12 Blutproben.

# Erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

## AdnaTest ProstateCancerSelect

### Ausrüstung

- Rührchenrotator für 15-ml- und 1,5-ml-Röhrchen (z. B. ELMi Ltd., Kat.-Nr. IMIX-03)
- Magnetpartikel-Konzentratoren
  - AdnaMag-L (Kat.-Nr. 399921)
  - AdnaMag-S (Kat.-Nr. 399911)

### Material

- AdnaTube Tubes (AdnaTube Röhrchen) (Kat.-Nr. 399932) für Arbeiten mit BD Vacutainer® ACD-A-Röhrchen
- Sterile, RNase-freie 10-ml-Glas- oder Kunststoffpipetten oder -pipettor
- Sterile, RNase-free 1.5 ml reaction tubes (Sterile, RNase-freie 1,5-ml-Reaktionsröhrchen) (z. B. Sarstedt, Kat.-Nr. 72.690)
- Pipetten und RNase-freie Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere zum Pipettieren von Volumina von 100 µl bis 1000 µl

### Reagenzien

- Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.0–7.3 (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,0–7,3 (z. B. Fisher, Kat.-Nr. VX14190169, D-PBS)

# AdnaTest ProstateCancerDetect

## Ausrüstung

- Tube rotator for 1.5 ml tubes (Röhrchenrotator für 1,5-ml-Röhrchen) (z. B. ELMi Ltd., Kat.-Nr. IMIX-03)
- Magnetic particle concentrator AdnaMag-S (Magnetpartikel-Konzentrator AdnaMag-S) (Kat.-Nr. 399911)
- Thermoblock oder Wasserbad (65 °C)
- Thermocycler mit heizbarem Deckel und einer Heizrate von 2 °C/s.
- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)

## Material

- Sterile, RNase-freie dünnwandige 0,2-ml-PCR-Röhrchen
- Sterile, RNase-free 1.5 ml reaction tubes (Sterile, RNase-freie 1,5-ml-Reaktionsröhrchen) (z. B. Sarstedt, Kat.-Nr. 72.690)
- Pipetten und RNase-freie Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere zum Pipettieren von Volumina von 1 µl bis 200 µl

## Reagenzien

- Sensiscript® RT Kit (QIAGEN, Kat.-Nr. 205211, 50 Reaktionen)
  - **Hinweis:** Das Sensiscript RT Kit (Kat.-Nr. 205211) reicht nur für 25 Proben, weil für jede Reaktion das doppelte Volumen erforderlich ist.
- Recombinant RNasin, RNase-inhibitor, 2500 U (Rekombinantes RNasin, RNase-Inhibitor, 2500 U) (Promega, Kat.-Nr. N2511)
- HotStarTaq® Master Mix Kit (QIAGEN, Kat.-Nr. 203443, 250 U)
- Zerstoßenes Eis

---

# Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

Für in-vitro-diagnostische Anwendungen

## Sicherheitshinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (SDS) entnehmen. Diese sind im praktischen, kompakten PDF-Format online unter [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) verfügbar; hier können Sie die Sicherheitsdatenblätter zu allen Kits und Kit-Komponenten von QIAGEN einsehen und ausdrucken.

Proben- und Testabfälle sind gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.

## Informationen zur Anwendung

Diese Tests dürfen nur von Fachpersonal, das molekularbiologische Techniken beherrscht, durchgeführt werden.

## Patente

AdnaTest ProstateCancerDetect erfordert Lizenzen der Firma Hoffmann-La Roche AG, Basel. Der Kauf des AdnaTest ProstateCancerDetect berechtigt den Nutzer nicht, die PCR ohne Lizenz durchzuführen.

---

# Lagerung und Handhabung der Reagenzien

## Lagerung

Das System AdnaTest ProstateCancer wird in drei Packungen geliefert. Der AdnaTest ProstateCancerSelect (Kat.-Nr. 395432) und die AdnaTest RNA Reagens Packung 1 (Packung 1 von Kat.-Nr. 396432) müssen bei 2–8 °C gelagert werden. Die Komponenten dürfen nur bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.

Die AdnaTest ProstateCancerDetect Packung 2 (Packung 2 von Kat.-Nr. 396432) mit den AdnaTest PrimerMixes und AdnaTest Positivkontrollen müssen separat bei -30 bis -15 °C gelagert werden. Aliquotieren Sie die Primermischung, um eine mögliche Kontamination und wiederholte Temperaturveränderungen zu vermeiden. Die Komponenten dürfen nur bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.

## Handhabung

- ProstateSelect Beads enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Natriumazid ist zytotoxisch und muss daher vor der Benutzung der Beads entfernt werden. (Siehe „Protokoll: Anreicherung von Tumorzellen mit dem AdnaTest ProstateCancerSelect“ auf Seite 15.)
- Alle Komponenten und weiteren Reagenzien anderer Lieferanten sind den jeweiligen Anweisungen entsprechend zu lagern. Die Sicherheitsinformationen der jeweiligen Hersteller sind zu beachten.
- Tragen Sie Schutzhandschuhe, um Kontaminationen durch DNA, RNA und RNasen zu vermeiden.
- Aliquotieren Sie die ProstateSelect Beads, um eine Kontamination zu vermeiden.

- 
- Bei der Durchführung des Tests müssen die Arbeitsschritte in der angegebenen Reihenfolge durchgeführt und alle angegebenen Spezifikationen in Bezug auf Inkubationszeiten und -temperaturen eingehalten werden.
  - Proben, in denen die zur Selektion verwendeten Beads während der Zellanreicherung agglutinieren, sind zu verwerfen.
  - Die Probenverarbeitung, einschließlich reverser Transkription und anschließender Analyse der amplifizierten PCR-Produkte, wenn möglich, in unterschiedlichen Räumen durchführen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
  - Die Verwendung von Produkten anderer, nicht genannter Hersteller kann die Ergebnisse beeinträchtigen.
  - Die Hygiene- und Sicherheitsvorschriften des Labors (z. B. das Tragen von Laborkittel, Schutzbrille und Schutzhandschuhen) sind einzuhalten.

---

# Lagerung und Handhabung der Proben

## Probenvorbereitung

- Blutproben müssen vor der Anwendung therapeutischer Wirkstoffe entnommen werden. Der AdnaTest ProstateCancerSelect darf frühestens 7 Tage nach der letzten therapeutischen Intervention angewendet werden!
- Blutentnahme: Wenn zum Probentransport weniger als 4 Stunden benötigt werden, Röhrchen mit EDTA als Antikoagulans (z. B. S Monovette® K3 EDTA, Sarstedt [Kat.-Nr. 01.1605.001]) verwenden und mindestens 7,5 ml Vollblut entnehmen.
- Wenn zum Probentransport mehr als 4 Stunden benötigt werden, BD Vacutainer ACD-A-Röhrchen (Becton Dickinson GmbH, Kat.-Nr. 366645 [EU]; 364606 [US]) verwenden und mindestens 8,5 ml Vollblut entnehmen. Vor der weiteren Verarbeitung mit dem AdnaTest müssen 5 ml ACD-A-Blut in ein AdnaTube Sample Tube (AdnaTube Probenröhrchen), Kat.-Nr. 399932, überführt werden.
- Blut muss sofort bei 4–8 °C aufbewahrt werden.
- Proben sind so rasch wie möglich zu verarbeiten, jedoch nicht mehr als 4 Stunden nach der Blutentnahme bei Verwendung von Standard-EDTA-Röhrchen oder innerhalb von 30 Stunden bei Verwendung von BD Vacutainer Blutentnahmeröhrchen in Kombination mit AdnaTubes.
- Die Blutproben dürfen nicht hämolytisch werden.

---

# Protokoll: Anreicherung von Tumorzellen mit dem AdnaTest ProstateCancerSelect

## Wichtige Hinweise vor Beginn

- Lesen Sie vor Beginn der Arbeitsschritte die Abschnitte „Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen“ (auf Seite 11), „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ (auf Seite 12) und „Lagerung und Handhabung der Proben“ (auf Seite 14).
- Vor der Verwendung der ProstateSelect Beads müssen diese, wie nachfolgend in Abschnitt „Verfahren A: Vorbereitung der ProstateSelect Beads“ beschrieben, gewaschen werden, um Natriumazid zu entfernen.
- Verwenden Sie bitte die mitgelieferten 1,5-ml-Entnahmeröhrchen nur für den angegebenen Arbeitsschritt im Protokoll.

## Vorbereitende Schritte

- Sicherstellen, dass der AdnaTest Lyse-/Bindungspuffer auf Raumtemperatur erwärmt ist. Falls ein Präzipitat erkennbar ist, das Reagenz auf Raumtemperatur erwärmen und mischen, bis das Präzipitat vollständig gelöst ist.

## Verfahren A: Vorbereitung der ProstateSelect Beads

1. Die ProstateSelect Beads durch Pipettieren vollständig resuspendieren; nicht vortexen!
2. Das Volumen der ProstateSelect Beads, das für die Verarbeitung aller Proben erforderlich ist (100 µl pro Probe) berechnen und das berechnete Volumen in ein 1,5-ml-Reaktionsröhrchen (nicht mitgeliefert) überführen.  
  
Wenn mehr als 10 Proben verarbeitet werden, zusätzliche 1,5-ml-Reaktionsröhrchen (nicht mitgeliefert) verwenden.
3. Das Röhrchen in den AdnaMag-S stellen.

4. Den Überstand nach 1 Minute mit einer Pipette entfernen.

**Hinweis:** Bei der Entfernung des Überstandes dürfen die Partikel nicht berührt werden!

5. Waschschritte:

5a. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-S herausnehmen.

5b. 1 ml PBS hinzufügen und die Partikel durch wiederholtes Pipettieren resuspendieren.

5c. Den Magnetschieber in den AdnaMag-S einsetzen.

5d. Den Überstand nach 1 Minute vollständig mit einer Pipette entfernen.

5e. Die Schritte 5a bis 5d zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschschritte).

6. Das Röhrchen aus dem AdnaMag-S herausnehmen und die Beads in PBS auf das ursprüngliche Volumen (100 µl pro Probe) resuspendieren. Wie nachfolgend in Abschnitt „Verfahren B: Selektion von Tumorzellen“ beschrieben fortfahren.

## Verfahren B: Selektion von Tumorzellen

1. Bei Verwendung von Standard-EDTA-Röhrchen 5 ml einer Blutprobe in ein 15-ml-Entnahmeröhrchen pipettieren.

Bei Verwendung von ACD-A-Blut in einem BD Vacutainer ACD-A-Röhrchen 5 ml Blut in ein AdnaTube überführen.

**Hinweis:** AdnaTubes sind bei Verwendung von BD Vacutainer ACD-A-Röhrchen obligatorisch.

2. Die (in Schritt 6 von Verfahren A vorbereiteten) ProstateSelect Beads durch Pipettieren vollständig resuspendieren und jeder Blutprobe 100 µl dieser Beads zusetzen.

3. Die Röhrchen 30 Minuten lang bei Raumtemperatur in einem Gerät, das sowohl Drehen als auch Neigung ermöglicht, langsam (bei etwa 5 rpm) drehen lassen.

4. Die Röhrchen in den AdnaMag-L ohne den Magnetschieber stellen. Durch Abwärtsschwingen des AdnaMag-L am Deckel verbliebene Blutropfen ablösen.

5. Den Magnetschieber einsetzen und die Röhrchen 3 Minuten lang bei Raumtemperatur im AdnaMag-L inkubieren.

6. Den Blutüberstand mit einer 10-ml-Pipette vollständig entfernen, ohne die Beads zu berühren.

**Hinweis:** Bei der Entfernung des Überstandes dürfen die Partikel nicht berührt werden!

7. Waschschritte:

7a. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-L herausnehmen.

7b. 5 ml PBS hinzufügen. Die Röhrchen schließen und den AdnaMag-L 5 Mal vorsichtig hin und her schwenken, um die Magnetpartikel/Zellkomplexe zu resuspendieren.

7c. Den AdnaMag-L mit den Röhrchen abwärtsschwingen, um am Deckel verbliebene Tropfen abzulösen.

7d. Den Magnetschieber in den AdnaMag-L einsetzen und für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubieren.

7e. Den Überstand mit einer Pipette vollständig entfernen.

7f. Die Schritte 7a bis 7e zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschschritte).

8. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-L herausnehmen.

9. Die Magnetpartikel/Zellkomplexe in 1 ml PBS resuspendieren und jede Probe in ein 1,5-ml-Reaktionsröhrchen (nicht mitgeliefert) überführen.

10. Die Reaktionsröhrchen in den AdnaMag-S mit eingeschobenem Magnetschieber stellen.

**Hinweis:** Der Magnetschieber des AdnaMag-S kann in zwei unterschiedlichen Positionen eingesetzt werden. Den Magnetschieber immer mit nach vorn gerichteter weißer Kunststoffolie einsetzen, damit sich die Magnete nahe an den Reaktionsröhrchen befinden.

11. Den Überstand nach 1 Minute vollständig mit einer Pipette entfernen, um die anschließende Zellyse zu optimieren.

12. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-S herausnehmen.

13. Jedem Reaktionsröhrchen 200 µl AdnaTest Lyse-/Bindungspuffer (auf Raumtemperatur erwärmt) zusetzen. Durch mindestens fünfmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendieren.

14. Den Magnetschieber in den AdnaMag-S einsetzen und für 1 Minute inkubieren.

15. Den Überstand (Zellysat) in neue 1,5-ml-Reaktionsröhrchen (mitgeliefert) überführen.

---

16. Die Röhren mit den Beads verwerfen.

17. Umgehend mit der mRNA-Isolierung fortfahren (siehe „Protokoll: Nachweis von Prostatakrebs-assoziiierter Genexpression in angereicherten Tumorzellen mit dem AdnaTest ProstateCancerDetect“, auf Seite 19) oder die Zellysate bei -20 °C maximal 2 Wochen lang lagern.

---

# Protokoll: Nachweis von Prostatakrebs- assoziiierter Genexpression in angereicherten Tumorzellen mit dem AdnaTest ProstateCancerDetect

## Wichtige Hinweise vor Beginn

- Lesen Sie vor Beginn der Arbeit die Abschnitte „Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen“ (auf Seite 11) und „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ (auf Seite 12).
- Die Isolierung von mRNA und die reverse Transkription sind in Verfahren A bis C beschrieben.
- Verwenden Sie bitte die mitgelieferten 1,5-ml-Entnahmeröhrchen nur für den angegebenen Arbeitsschritt im Protokoll.

## Vorbereitende Schritte

- Sicherstellen, dass der AdnaTest Lyse-/Bindungspuffer auf Raumtemperatur erwärmt ist. Falls ein Präzipitat erkennbar ist, das Reagenz auf Raumtemperatur erwärmen und mischen, bis das Präzipitat vollständig gelöst ist.
- RNA-Reinigungspuffer A und RNA-Reinigungspuffer B auf Raumtemperatur erwärmen. Tris-HCL-Puffer auf Eis stellen.
- Den 10x Puffer RT und die dNTPs aus dem Sensiscript RT Kit bei Raumtemperatur auftauen lassen. Auf dem Vortexmischer mischen. Kurz zentrifugieren und auf Eis stellen. RNase-freies Wasser (Bestandteil des Sensiscript RT Kits) auftauen lassen.
- Einen Thermoblock oder ein Wasserbad auf 65 °C vorheizen.

## Verfahren A: Vorbereitung der Oligo(dT)<sub>25</sub> Beads

1. Die Oligo(dT)<sub>25</sub> Beads durch Pipettieren vollständig resuspendieren; nicht vortexen!
2. Das für die Verarbeitung aller Proben erforderliche Bead-Volumen (20 µl pro Probe plus 10 %) berechnen und das berechnete Volumen in ein RNase-freies 1,5-ml-Reaktionsröhrchen (nicht mitgeliefert) überführen.
3. Das Röhrchen in den AdnaMag-S stellen.

**Hinweis:** Der Magnetschieber des AdnaMag-S kann in zwei unterschiedlichen Positionen eingesetzt werden. Den Magnetschieber immer mit nach vorn gerichteter weißer Kunststoffolie einsetzen, damit sich die Magnete nahe an den Reaktionsröhrchen befinden.

4. Den Überstand nach 1 Minute mit einer Pipette entfernen.
5. Waschschritte:
  - 5a. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-S herausnehmen.
  - 5b. Das ursprüngliche Volumen (Schritt 2 auf Seite 20) AdnaTest Lyse-/Bindungspuffer hinzufügen und die Beads durch mehrmaliges Pipettieren resuspendieren. Vorsichtig resuspendieren, um Schaumbildung zu vermeiden.
  - 5c. Den Magnetschieber in den AdnaMag-S einsetzen.
  - 5d. Nach 1 Minute den Überstand vollständig entfernen.
  - 5e. Die Schritte 5a bis 5d einmal wiederholen (insgesamt zwei Waschschritte).
6. Das Röhrchen aus dem AdnaMag-S herausnehmen und die Beads in AdnaTest Lyse-/Bindungspuffer auf das ursprüngliche Volumen resuspendieren (Schritt 2 auf Seite 20). Mit „Verfahren B: mRNA-Isolierung“ fortfahren.

## Verfahren B: mRNA-Isolierung

1. 20 µl Oligo(dT)<sub>25</sub> Beads (Schritt 6 oben) in jedes Röhrchen mit Zellysat geben (Schritt 15 auf Seite 17).
2. Die Röhrchen 10 Minuten lang bei Raumtemperatur in einem Gerät, das sowohl Drehen als auch Neigung ermöglicht, langsam (bei etwa 5 rpm) drehen lassen.
3. Die Röhrchen in den AdnaMag-S stellen ohne den Magnetschieber stellen. Durch Abwärtsschwingen des AdnaMag-S am Deckel verbliebene Beads und Flüssigkeit ablösen.
4. Den Magnetschieber einsetzen und den Überstand nach 1 Minute entfernen.
5. Waschschritte 1:
  - 5a. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-S herausnehmen.
  - 5b. Jedem Röhrchen 100 µl RNA-Reinigungspuffer A zusetzen und die Beads durch mehrmaliges Pipettieren resuspendieren. Um einen Verlust an Beads zu verhindern, den Deckel und die Röhrchenwand gründlich spülen.
  - 5c. Den Magnetschieber in den AdnaMag-S einsetzen.
  - 5d. Nach 1 Minute den Überstand vollständig entfernen.
  - 5e. Die Schritte 5a bis 5d einmal wiederholen (insgesamt zwei Waschschritte).
6. Waschschritte 2:
  - 6a. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-S herausnehmen.
  - 6b. Jedem Röhrchen 100 µl RNA-Reinigungspuffer B zusetzen. Die Beads durch Pipettieren resuspendieren und in ein neues 1,5-ml-Reaktionsröhrchen (mitgeliefert) überführen.
  - 6c. Den Magnetschieber in den AdnaMag-S einsetzen.
  - 6d. Nach 1 Minute den Überstand vollständig entfernen. Bei diesem Schritt ist Vorsicht geboten (das Pellet im Auge behalten), da die Beads abrutschen und versehentlich mit entfernt werden können.
  - 6e. Die Schritte 6a bis 6d in denselben Reaktionsröhrchen einmal wiederholen (insgesamt zwei Waschschritte).

7. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-S herausnehmen.
8. Jedem Röhrchen 100 µl eiskalten Tris-HCL-Puffer zusetzen und die Beads durch Pipettieren resuspendieren.
9. Den Magnetschieber in den AdnaMag-S einsetzen.
10. Nach 1 Minute den Überstand vollständig entfernen.
11. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-S herausnehmen.
12. Den mRNA/Bead-Komplex in 14,75 µl RNase-freiem Wasser resuspendieren.
13. Die Röhrchen in einen Thermoblock oder in ein Wasserbad überführen und 5 Minuten lang bei 65 °C inkubieren.
14. Die Röhrchen sofort mindestens 2 Minuten lang auf Eis stellen.
15. Umgehend (innerhalb von 5 Minuten) mit der reversen Transkription fortfahren (Verfahren C: Reverse Transkription mit dem Sensiscript RT Kit).  
Der mRNA/Bead-Komplex darf nicht gelagert werden!

#### Verfahren C: Reverse Transkription mit dem Sensiscript RT Kit

1. Den RT Master Mix auf Eis vorbereiten. Die Herstellung des RT Master Mix für die entsprechende Anzahl an Proben erfolgt gemäß Tabelle 1.  
Das Volumen des RT Master Mix sollte 10 % größer als das Volumen, das für die Gesamtzahl der Reaktionen mit reverser Transkription berechnet wurde. Es muss stets ein Reaktionsansatz ohne Zugabe von mRNA als Negativkontrolle (RT-Kontrolle) vorbereitet werden.
2. Den RT-Master Mix vortexen. Kurz zentrifugieren und 5,25 µl pro Reaktion in 0,2-ml-PCR-Röhrchen pipettieren.
3. Die mRNA/Bead-Komplexe (Schritt 12 auf Seite 22) vorsichtig mit einer Pipette resuspendieren. Das gesamte Volumen in das 0,2-ml-PCR-Reaktionsröhrchen mit dem RT Master Mix überführen. Durch wiederholtes Pipettieren gründlich mischen.

**Tabelle 1. Reverse Transkription – Reaktionsschema**

Komponente	Volumen
<b>RT Master Mix</b>	
10x Buffer RT (10x Puffer RT)	2,0 µl
dNTP Mix (jeweils 5 mM dNTP)	2,0 µl
RNase-Inhibitor, 40 U/µl (Promega)	0,25 µl
Sensiscript Reverse Transkriptase	1,0 µl
<b>RNA-Vorlage*</b>	14,75 µl
mRNA/bead complex or RNase free water (mRNA/Bead-Komplex oder RNase-freies Wasser)	
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20,0 µl</b>

\* Als RT-Kontrolle 14,75 µl RNase-freies Wasser anstelle des mRNA/Bead-Komplexes hinzufügen. Das Volumen des mRNA/Bead-Komplexes kann leicht variieren. Verwenden Sie in jedem Fall das gesamte Volumen für die reverse Transkription!

4. Die cDNA-Synthese erfolgt in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen (Tabelle 2).

**Tabelle 2. Reverse Transkription – Programm**

Temperatur	Zeit
37 °C	60 Minuten
93 °C	5 Minuten
4 °C	∞

5. Die Reaktionsröhrchen mit der cDNA auf Eis stellen oder maximal 4 Wochen lang bei -20 °C lagern.

Mit „Protokoll: Multiplex- und Singleplex-PCR“ auf Seite 23 fortfahren.

---

# Protokoll: Multiplex- und Singleplex-PCR

Wichtiger Hinweis, der vor der Durchführung zu beachten ist

- Lesen Sie vor Beginn der Arbeit die Abschnitte „Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen“ (auf Seite 11) und „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ (auf Seite 12).

## Vorbereitende Schritte

- HotStarTaq Master Mix (QIAGEN), AdnaTest PrimerMix ProstateDetect, AdnaTest Positivkontrolle Prostata, AdnaTest PrimerMix AR-Detect, AdnaTest Positivkontrolle AR und RNase-freies Wasser auftauen. Vortexen, kurz zentrifugieren und auf Eis stellen.

## Verfahren A: Multiplex-PCR (AdnaTest ProstateDetect)

1. Die Herstellung des PCR Master Mix für die entsprechende Anzahl an Proben erfolgt gemäß Tabelle 3.

Die Berechnung des Volumens des PCR Master Mix sollte mindestens 10 % zusätzliches Volumen einschließen. Es müssen stets eine AdnaTest Positivkontrolle Prostata, RNase-freies Wasser als Negativkontrolle und die RT-Kontrolle mitgeführt werden.

2. Pro Ansatz 21,0 µl des PCR Master Mix in ein 0,2-ml-PCR-Reaktionsröhrchen pipettieren. Die cDNA/Bead-Mischung durch Pipettieren resuspendieren und 4,0 µl davon in jedes Reaktionsröhrchen geben.

**Hinweis:** Als Negativkontrolle 4,0 µl RNase-freies Wasser anstelle von cDNA hinzufügen.

**Tabelle 3. Vorbereitung der Multiplex-PCR**

Komponente	Volumen
<b>Multiplex PCR Master Mix</b>	
HotStarTaq Master Mix	12,5 µl
RNase-free water (RNase-freies Wasser)	4,5 µl
PrimerMix ProstateDetect	4,0 µl
cDNA oder RT-Kontrolle oder Negativkontrolle (RNase-freies Wasser) oder Positivkontrolle (C+) jeweils:	4,0 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25,0 µl</b>

3. Für die PCR wird ein Thermocycler gemäß dem in Tabelle 4 beschriebenen Programm verwendet. Für den Thermocycler eine Heizrate von 2 °C/Sekunde auswählen.  
Die Durchführung der PCR umfasst insgesamt 42 Zyklen.

**Tabelle 4. Programm der PCR-Zyklen**

	Temperatur	Zeit
<b>Anfänglicher Aktivierungsschritt</b>	95 °C	15 Minuten
<b>3-Schritt-Zyklus</b>		
Denaturierung:	94 °C	30 Sekunden
Annealing:	61 °C	30 Sekunden
Verlängerung:	72 °C	30 Sekunden
Anzahl der Zyklen:	42	
<b>Letzte Verlängerung:</b>	72 °C	10 Minuten
<b>Abkühlen:</b>	4 °C	∞

## Verfahren B: Singleplex-PCR (AdnaTest AR-Detect)

1. Die Herstellung des PCR Master Mix für die entsprechende Anzahl an Proben erfolgt gemäß Tabelle 5.

Die Berechnung des Volumens des PCR Master Mix sollte mindestens 10 % zusätzliches Volumen einschließen. Es müssen stets eine AdnaTest Positivkontrolle, RNase-freies Wasser als Negativkontrolle und die RT-Kontrolle mitgeführt werden.

- Pro Ansatz 21,0 µl des PCR Master Mix in ein 0,2-ml-PCR-Reaktionsröhrchen pipettieren. Die cDNA/Bead-Mischung durch Pipettieren resuspendieren und 4,0 µl davon in jedes Reaktionsröhrchen geben.

**Hinweis:** Als Negativkontrolle 4,0 µl RNase-freies Wasser anstelle von cDNA hinzufügen.

**Tabelle 5. Vorbereitung der Singleplex-PCR**

Komponente	Volumen
<b>Singleplex PCR Master Mix</b>	
HotStarTaq Master Mix	12,5 µl
RNase-free water (RNase-freies Wasser)	4,5 µl
PrimerMix AR-Detect	4,0 µl
cDNA oder RT-Kontrolle oder Negativkontrolle (RNase-freies Wasser) oder Positivkontrolle (C+) jeweils:	4,0 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25,0 µl</b>

- Für die PCR wird ein Thermocycler gemäß dem in Tabelle 6 beschriebenen Programm verwendet. Für den Thermocycler eine Heizrate von 2 °C/Sekunde auswählen. Die Durchführung der PCR umfasst insgesamt 35 Zyklen.

**Tabelle 6. Programm der PCR-Zyklen**

	Temperatur	Zeit
<b>Anfänglicher Aktivierungsschritt</b>	95 °C	15 Minuten
<b>3-Schritt-Zyklus (35 Zyklen)</b>		
Denaturierung:	94 °C	30 Sekunden
Annealing:	60 °C	30 Sekunden
Verlängerung:	72 °C	60 Sekunden
Anzahl der Zyklen:	35	
<b>Letzte Verlängerung:</b>	72 °C	10 Minuten
<b>Abkühlen:</b>	4 °C	∞

## Interpretation der Ergebnisse

### Fragmentanalyse mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer

Die Analyse erfolgt mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) auf einem DNA 1000 LabChip®. Befolgen Sie die Anleitungen im Handbuch des DNA 1000 LabChip und stellen Sie sicher, dass keine Beads in den Chip gelangen. Im Gel befindliche Magnetpartikel können fehlerhafte Ergebnisse liefern.

1. Die Bioanalyzer-Software **2100 expert** starten. Wählen Sie unter **Contexts Instrument** und klicken Sie auf die Schaltfläche **Assay** neben **Assay Selection (Assay-Auswahl)**.
2. Wählen Sie **Electrophoresis > DNA 1000 Series II.xsy**. Bereiten Sie den Chip vor und starten Sie den Lauf.
3. Stellen Sie für die Auswertung der Ergebnisse die Detektionsgrenze wie folgt ein:
  - 3a. Wählen Sie unter **Contexts Data** und klicken Sie anschließend auf die Registerkarte **Assay Properties (Assay-Eigenschaften)**. Wählen Sie im Drop-down-Menü auf der rechten Seite **Global** und **Normal**.

- 3b. Wählen Sie **Sample Setpoints > Integrator > height threshold (FU)** und setzen Sie diesen Wert auf **0** (der vorgegebene Wert ist **20**), um alle Signale zu erfassen.

### Analyse der mit AdnaTest ProstateDetect erhaltenen Ergebnisse

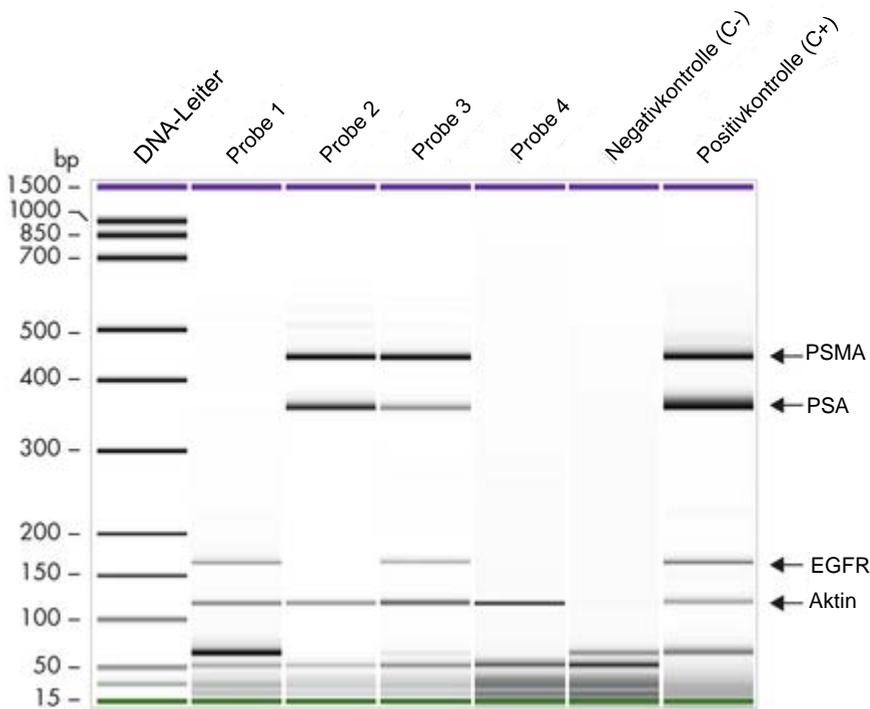
Der Test wird positiv gewertet, wenn ein PCR-Fragment mindestens eines Tumor-assoziierten Transkripts (PSMA, PSA oder EGFR) eindeutig nachgewiesen wird.

Bei Verwendung des Agilent 2100 Bioanalyser sind Peaks mit einer Konzentration von  $\geq 0,10$  ng/ $\mu$ l positiv (Abbildung 3).

Das Fragment des Kontrollgens Aktin muss in allen Patientenproben nachweisbar sein (interne PCR-Kontrolle). Ein Aktin-Signal stellt eine Positivkontrolle für erfolgreiche Zellseparation, reverse Transkription und Multiplex-PCR dar. Die Negativkontrolle und RT-Kontrollproben dürfen keine Banden enthalten, die größer sind als 80 Basenpaare (Primerdimere).

Fragmente mit einer Größe von mehr als 900 Basenpaaren deuten auf eine Kontamination mit genomischer DNA hin. In diesem Fall war der Separationsprozess nicht erfolgreich und die Ergebnisse sind ungültig.

**WICHTIG: Wird das Protokoll nicht ganz genau befolgt, kann dies zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen führen.**



**Abbildung 3. Ergebnisse des AdnaTest ProstateCancerDetect für mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer analysierte Multiplex-PCR-Proben.** Die erste Spur zeigt den DNA-Größenstandard (DNA-Leiter). Probe 1 ist positiv auf EGFR, Probe 2 ist positiv auf PSMA und PSA und Probe 3 ist positiv auf PSMA, PSA und EGFR. Probe 4 ist negativ. Aktin ist in den Proben 1 bis 4 nachweisbar. Die PCR-Negativkontrolle (C-) und die Positivkontrolle (C+) sind in den beiden letzten Spuren zu sehen.

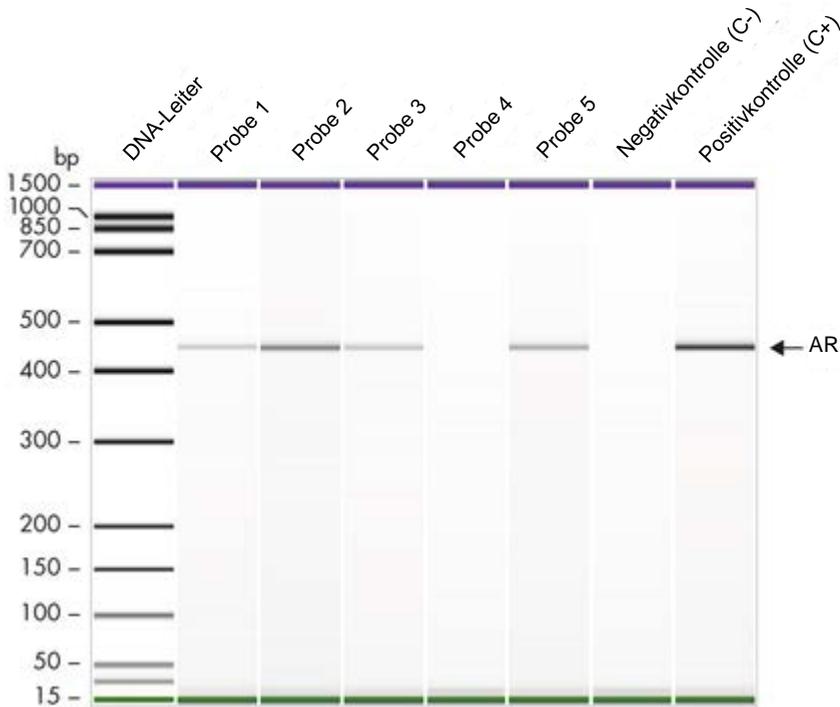
### Analyse der Ergebnisse des AdnaTest AR-Detect

Bei Verwendung des Agilent 2100 Bioanalyzer sind Peaks mit einer Konzentration von  $\geq 0,15 \text{ ng}/\mu\text{l}$  positiv auf AR (Abbildung 4).

Das Fragment des Kontrollgens Aktin muss in allen Patientenproben nachweisbar sein (interne PCR-Kontrolle). Ein Aktin-Signal stellt eine Positivkontrolle für erfolgreiche Zellseparation, reverse Transkription und Singleplex-PCR dar. Die Negativkontrolle und RT-

Kontrollproben dürfen keine Banden enthalten, die größer sind als 80 Basenpaare (Primerdimere).

**WICHTIG:** Wird das Protokoll nicht ganz genau befolgt, kann dies zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen führen.



**Abbildung 4. Ergebnisse des AdnaTest ProstateCancerDetect für Singleplex-PCR-Proben.** Die erste Spur zeigt den DNA-Größenstandard (DNA-Leiter). Proben 1 bis 3 und Probe 5 sind positiv auf AR. Probe 4 ist negativ. Die PCR-Negativkontrolle (C-) und die Positivkontrolle (C+) sind in den beiden letzten Spuren zu sehen.

---

## Hilfe zur Fehlerbehebung

In diesem Abschnitt zur Fehlerbehebung finden Sie hilfreiche Informationen zur Behebung möglicher Probleme. Weitere Informationen finden Sie auf der Seite „Frequently Asked Questions“ (Häufig gestellte Fragen) unseres Support-Centers unter: **[www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx)**. Darüber hinaus stehen die Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler beim QIAGEN Technischen Service unterstützend zur Seite, falls Sie Fragen zu den Informationen und/oder Protokollen in diesem Handbuch haben sollten (Kontaktinformationen siehe unter **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**).

## Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von QIAGEN wird jede Charge von AdnaTest ProstateCancerSelect und AdnaTest ProstateCancerDetect nach festgelegten Prüfkriterien kontrolliert, um eine einheitliche Produktqualität sicherzustellen.

## Anwendungseinschränkungen

Alle Reagenzien dürfen ausschließlich zur In-vitro-Diagnostik verwendet werden.

Die Anwendung darf nur durch Personal erfolgen, das speziell in In-vitro-Diagnostik-Verfahren unterrichtet und ausgebildet wurde.

Der Bediener muss die Gebrauchsanweisung vor der Anwendung des Systems sorgfältig durchlesen.

Zur Gewährleistung optimaler PCR-Ergebnisse muss die Gebrauchsanweisung genau befolgt werden.

Die Verfallsdaten, die auf den Packungen und Etiketten aller Komponenten aufgedruckt sind, sind zu überprüfen. Die Komponenten dürfen nur bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.

Alle diagnostischen Ergebnisse müssen unter Berücksichtigung vorliegender klinischer und labortechnischer Daten interpretiert werden.

## Leistungsmerkmale

### Wiederfindung

Blutproben von gesunden Spendern wurden mit zwei kultivierten LnCap-Prostatakrebszellen versetzt (gespikt), um die mit dem AdnaTest ProstateCancerSelect/Detect erzielten Wiederfindungsraten zu ermitteln (Tabelle 7).

**Tabelle 7. AdnaTest ProstateCancer – Wiederfindungsrate von Tumorzellen, die Blutproben gesunder Spender zugesetzt wurden**

	Anzahl Positivproben	Gesamtzahl der Proben
Zusatz von zwei Tumorzellen zu 5 ml Blut	38 (95 %)	40

Die Wiederfindungsrate für den Nachweis von 2 Tumorzellen, die 5 ml Blut von gesunden Spendern zugesetzt wurden, beträgt 95 %.

### Spezifität

Mithilfe des AdnaTest ProstateCancerSelect/Detect wurden 40 gesunde Spender analysiert, um die Rate falsch positiver Ergebnisse bei dem vorgegebenen Schwellenwert (Konzentration von 0,10 ng/µl Fragment für jedes untersuchte Genprofil, mit Ausnahme von Aktin) zu ermitteln.

**Tabelle 8. Bestimmung der Spezifität**

Kontrollen	Gesamtzahl der Proben	Anzahl falsch positiver Proben	Spezifität (%)
Gesunde Spender	40	0 (0 %)	100

Der AdnaTest ProstateCancerSelect/Detect zeigte eine Spezifität von 100 % (Tabelle 8).

## Reproduzierbarkeit

Zwanzig Blutproben von gesunden Spendern wurden mit 10 LnCap-Prostatakrebszellen pro Probe versetzt. Die Blutproben wurden zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit von zwei Bedienern mit dem AdnaTest ProstateCancerSelect/Detect analysiert. Die Intra-Assay- und die Inter-Assay-Reproduzierbarkeit betragen 100 % (Tabelle 9).

**Tabelle 9. Reproduzierbarkeit des AdnaTest ProstateCancer Select/Detect**

Bediener	Positive AdnaTest-Ergebnisse/Proben	Intra-Assay-Reproduzierbarkeit (%)	Inter-Assay-Reproduzierbarkeit (%)
A	10/10	100	100
B	10/10	100	100

## Präzision

Zur Bestimmung der Präzision wurden Aliquots von cDNA gepoolt und mit dem AdnaTest ProstateCancerDetect analysiert. Zwei Bediener führten jeweils 3 unabhängige Messungen von 10 cDNA-Proben durch, d. h. insgesamt 30 Messungen. Die Intra-Assay- und die Inter-Assay-Präzision betragen 100 % (Tabelle 10).

**Tabelle 10. Präzision des AdnaTest ProstateCancerDetect**

Bediener	Positive AdnaTest-Ergebnisse/Proben	Intra-Assay-Präzision (%)	Inter-Assay-Präzision (%)
A	30/30	100	100
B	30/30	100	100

---

## Störsubstanzen

### Antikoagulantien

Die Entnahme und der Transport von Blut erfordern die Verwendung von Antikoagulantien. Heparin und Citrat führen jedoch nach Zugabe der immunomagnetischen Beads von AdnaTests zur Bildung von Aggregaten, was dazu führen kann, dass keine oder fehlerhafte Testergebnisse erhalten werden. EDTA und ACDA (Citrat/Dextrose/Adeninlösung A) sind hingegen mit den immunomagnetischen Beads von AdnaTests kompatibel.

### Hämolyse

Eine Hämolyse in Blutproben (rot erscheinende Plasmafraktion) ist in den meisten Fällen auf unsachgemäße Transport- oder Lagerungsbedingungen zurückzuführen. Derartige Proben können falsch negative Ergebnisse liefern und sind zu verwerfen.

### Chemotherapeutika, zielgerichtete Therapien und Antihormontherapien

Chemotherapeutika (Taxane, Cisplatin, Oxaliplatin, 5-FU, Anthracyclin, Irinotecan usw.) sind starke Zytotoxine, deren Anwesenheit in Blutproben zu Zellschädigungen oder schnellem Zelltod führen. Daher besteht bei Verwendung der immunomagnetischen Beads von AdnaTests eine hohe Wahrscheinlichkeit falsch negativer Ergebnisse. Nach der Verabreichung dieser Wirkstoffe benötigt der menschliche Körper für deren Entgiftung etwa 5 bis 7 Tage (Tabelle 11). Für Blutproben, die während dieses Zeitraums entnommen werden, dürfen keine immunomagnetischen Beads von AdnaTests verwendet werden.

**Tabelle 11. Halbwertszeiten von Chemotherapeutika**

Wirkstoff	Halbwertszeit	Literatur
5-Fluorouracil	Bis zu 20 Minuten	<a href="http://www.drugs.com/pro/fluorouracil-injection.html">www.drugs.com/pro/fluorouracil-injection.html</a>
Docetaxel	Bis zu 11,1 Stunden	<a href="http://www.drugs.com/pro/docetaxel.html">www.drugs.com/pro/docetaxel.html</a>
Cis-Platin	Bis zu 30 Minuten	<a href="http://www.drugs.com/pro/cisplatin.html">www.drugs.com/pro/cisplatin.html</a>
Carboplatin	Bis zu 5,9 Stunden	<a href="http://www.drugs.com/pro/carboplatin.html">www.drugs.com/pro/carboplatin.html</a>
Paclitaxel	Ungefähr 25,4 Stunden	<a href="http://www.drugs.com/pro/paclitaxel.html">www.drugs.com/pro/paclitaxel.html</a>

Die gleiche Vorsichtsmaßnahme wird auch für zielgerichtete Therapieregime wie Antikörper (Herceptin<sup>®</sup>, Bevacizumab, Cetuximab etc.), Tyrosinkinaseblocker (Olaparib, Iressa<sup>®</sup>, Erbitux<sup>®</sup>, Lapatinib usw.) und Antihormontherapien (Tamoxifen, Abirateron, Enzalutamid usw.) empfohlen, wenn diese als Einzelwirkstoffe oder in Kombination mit Chemotherapeutika verabreicht werden.

In klinischen Studien zum Nachweis des prognostischen Werts von zirkulierenden Tumorzellen (CTC), die mit immunomagnetischen Beads von AdnaTests identifiziert und charakterisiert wurden, wurden keine Störungen durch Chemotherapeutika, zielgerichtete Therapien oder Antihormontherapien beobachtet, vorausgesetzt die Wartezeit von mindestens 7 Tagen nach der Verabreichung der Therapie wurde eingehalten. Darüber hinaus wird auf eine mögliche, jedoch nicht wahrscheinliche Beeinträchtigung durch häufig verwendete Begleitmedikationen (Aspirin, Ibuprofen, Aprepitant, Steroide usw.) geachtet.

## Störende Umstände

### Blutgerinnung

Im Zusammenhang mit klinischen Studien kam es nach der Inkubation mit den immunomagnetischen Beads des *AdnaTest* zur Blutgerinnung, und zwar am häufigsten bei Patienten in einem späten Krankheitsstadium. Blutproben, in denen Blutgerinnung erkennbar ist, sind während des *AdnaTest*-Arbeitsablaufs aufgrund der erhöhten Viskosität schwierig zu verarbeiten und schwer zu pipettieren. Diese Proben enthalten ebenfalls eine inakzeptabel

---

hohe Zahl kontaminierter Leukozyten, was zu falsch positiven Ergebnissen führt. Derartige Proben sind zu verwerfen.

### Benigne organische und chronisch-entzündliche Erkrankungen

Eine benigne organische Erkrankung und chronische Entzündung wie z. B. Arthritis, benigne Prostatathyperplasie (BPH), Morbus Crohn usw. führen nicht zu falsch positiven AdnaTest-Ergebnissen.

### Akute Allergie

Bei akuten allergischen Reaktionen ist die Zahl kontaminierter Leukozyten nach der CTC-Anreicherung mit den immunomagnetischen Beads von AdnaTests erhöht. Daher können falsch positive Ergebnisse nicht vollständig ausgeschlossen werden.

### Klinische Studien

Insgesamt wurden 12 Patienten mit metastatischem kastrationsresistenten Prostatakarzinom (metastatic castrate-resistant prostate cancer, CRPC) während der Behandlung mit Docetaxel untersucht. Die erste Probe wurde zu Beginn der Behandlung (Baseline) analysiert und 2 weitere Proben wurden während der Nachbeobachtung analysiert.

In Bezug auf die AR-Aktivierung wurde eindeutig eine starke Korrelation zwischen der AR-Aktivierung und -Deaktivierung und der Rate der CTC-Elimination aufgrund der therapeutischen Intervention nachgewiesen. Die CTC-Positivitätsrate sank jedoch im Verlauf der Therapie von 70 % zu Beginn der Behandlung auf ~ 35 % während der Nachbeobachtung und die AR-Positivität sank von 55 % auf ~ 11 %. Aufgrund der Therapie hat die Behandlung mit Docetaxel eine stärkere Wirkung auf AR-positive CTC-Subklone als auf AR-negative CTC. Diese Daten stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Untersuchungen von Darshan et al. aus dem Jahr 2011, die zeigten, dass der nukleäre AR-Transport und der AR-Signalweg durch Taxane blockiert werden.

Diese Ergebnisse deuten auf die Spezifität und Empfindlichkeit des Nachweises von CTC in klinischen Proben von Prostatakrebspatienten sowie die Ermittlung von genetischen Profilen im Zusammenhang mit den therapeutische Zielstrukturen hin.

## Literatur

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. Online-Veröffentlichung 28. Juli 2011. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1417.

## Abkürzungen

AdnaMag-L	Magnetpartikel-Konzentrator (-groß)
AdnaMag-S	Magnetpartikel-Konzentrator (-klein)
AR	Androgenrezeptor
BP	Basenpaare
C+	Positivkontrolle
C-	Negativkontrolle
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor
kb	Kilobasen
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription

# Symbole



Kit enthält Reagenzien für <N> Tests.



Verwendbar bis



Zulässiger Temperaturbereich



Katalognummer



Gebrauchsanweisung beachten



Hersteller



In-vitro-Diagnostikum



Materialnummer



Global Trade Item Number (Globale Artikelnummer)

# Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
AdnaTest ProstateCancerSelect	Zur Isolierung von CTC und anschließenden Extraktion von mRNA aus humanem Vollblut für 12 Zubereitungen	395432
AdnaTest ProstateCancerDetect	RT-PCR Kit zum Nachweis von Prostatakrebs-assoziiierter Genexpression in angereicherten Tumorzellen	396432
<b>Verwandte Produkte</b>		
AdnaTubes	12 Probenröhrchen mit EDTA. Nur mit antikoaguliertem Blut verwenden, das in A-CDA-Blutentnahmeröhrchen von BD entnommen wurde	399932
AdnaMag-L	Für 8 Röhrchen, 15 ml	399921
AdnaMag-S	Für 8 Röhrchen, 1,5 ml	399911
Sensiscrypt RT Kit (50)	Für 50 Reverse-Transkription-Reaktionen: * Sensiscrypt Reverse Transkriptase, 150 µl 10x Puffer RT, 100 µl dNTP Mix (enthält 5 mM von jedem dNTP), 1,1 ml RNase-freies Wasser	205211
HotStarTaq Master Mix Kit (250 U)	3 x 0,85 ml HotStarTaq Master Mix (enthält 250 Einheiten HotStarTaq DNA Polymerase, PCR-Puffer mit 3 mM MgCl <sub>2</sub> und 400 µM von jedem dNTP) und 2 x 1,7 ml RNase-freies Wasser	203443

\* Das Sensiscrypt RT Kit (50) reicht bei Verwendung des AdnaTest ProstateCancerDetect nur für 25 Proben, weil für jede Reaktion das doppelte Volumen erforderlich ist.



Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Hinweise finden Sie im Handbuch oder der Gebrauchsanweisung des jeweiligen QIAGEN Kits. Handbücher und Gebrauchsanweisungen zu QIAGEN Kits finden Sie im Internet unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder bei Ihrem örtlichen Händler angefordert werden.

#### **Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für AdnaTest ProstateCancerSelect und AdnaTest ProstateCancerDetect**

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Nutzer des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen und nur mit den Komponenten, die im Kit mitgeliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen seiner Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zu den Kits gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zu den Kits gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der Anwendungen, die in den mit dem Produkt, diesem Handbuch, bereitgestellten Protokollen sowie zusätzlichen, unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) verfügbaren Protokollen beschrieben werden. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN-Anwendern für andere QIAGEN-Anwender zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN nicht eingehend geprüft oder optimiert. QIAGEN übernimmt für diese Protokolle keine Garantie und garantiert auch nicht, dass sie keine Rechte Dritter verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieses Kit und/oder die mit diesem Kit durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieses Kit und seine Komponenten sind für den einmaligen Gebrauch lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, aufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Nutzer des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen könnten oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder seinen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen finden Sie im Internet unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) nachgelesen werden.

Markennamen: QIAGEN®, Sample to Insight®, HotStarTaq®, Sensiscript® (QIAGEN Group); Agilent® (Agilent Technologies, Inc.); ERBITUX® (ImClone LLC., eine hundertprozentige Tochtergesellschaft von 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, alle Rechte vorbehalten.

---

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen.

---

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen.

---

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen.

---

Bestellungen [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Technischer Support [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Website [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)