

BRUKSANVISNING



Artikelnummer/referensnummer CN 20201604

För att uppnå tillförlitliga resultat måste dessa instruktioner följas noggrant.



www.colonode.se/downloads/Bruksanvisning

HiloProbe AB

www.hiloprobe.se; www.colonode.se

Tvistevägen 48C, SE-90736 Umeå, Sverige

COPYRIGHT© HiloProbe AB, 2022

Version 3, 2022-05-16

Artikelnummer: 60459-3.0

Innehållsförteckning

	Sida
1. Introduktion	3-5
1.1 Avsedd användning	3
1.2 Bakgrund	3
1.3 Analysprincip	4
1.4 Design	5
2. Material och utrustning	5-6
2.1 Innehåll	5
2.2 Material som krävs men som inte tillhandahålls	5
2.3 Programvara	6
2.4 Nedladdningar	6
3. Förvaringskrav	6
4. Försiktighetsåtgärder och säkerhet	6
5. Begränsningar	7
6. Provkrav	7-8
6.1 Prover	7
6.2 Homogenisering och RNA-extraktion	7
6.3 RNA-renhet och koncentration	8
7. Bruksanvisning	8-13
7.1 Riktlinjer för att utföra ColoNode®-kit analyser	8
7.2 Schema för märkning och pipettering	9
7.3 Avläsning av resultat från analysinstrument	12
7.4 Resultatanalys med programvaran ColoNode® Software	12
8. Betydelse av symboler som används på etiketter	13
9. Meddelande till köpare	13
10. Referenser	13
11. Förkortningar	14
12. Kontaktinformation	14

1. Introduktion

ColoNode[®]-kitet är avsett att användas för *in vitro* diagnostik (IVD).

1.1 Avsedd användning

ColoNode[®]-kitet skall användas för att upptäcka tumörceller i lymfkörtlar från patienter med kolorektal cancer (CRC) och för att bestämma tumörcellernas aggressivitet. Resultatet skall hjälpa behandlande läkare att fatta beslut om adjuvant kemoterapi och uppföljning och är avsett att användas som ett komplement till histopatologi.

ColoNode[®]-kitet mäter mRNA-expressionsnivåerna för fem biomarkörer, dvs CEACAM5 (CEA celladhesion molecule 5 också känd som carcinoembryonalt antigen), KLK6 (kallikrein-relaterat peptidas 6), SLC35D3 (solute carrier family 35 member D3), POSTN (periostin) och MUC2 (mucin 2) såväl som mängden av 18S rRNA (18S ribosomalt RNA) i total-RNA extraherat från lymfkörtlar från CRC-patienter.

1.2. Bakgrund

Regionala lymfkörtelmetastaser är den enskilt viktigaste prognostiska riskfaktorn för återfall i cancer hos patienter som genomgått potentiellt kurativ kirurgi för CRC.¹⁻³ Biomarkör-mRNA har stor potential som verktyg för lymfkörtelanalys i CRC. Analys av biomarköruttryck på mRNA-nivå har flera fördelar jämfört med proteinnivån eftersom flera biomarkörer enkelt kan analyseras i samma RNA-extrakt, och en stor volym av lymfkörteln (potentiellt hela körteln) kan analyseras.⁴

I ColoNode[®]-kitet analyseras sex målgener. Fyra av dessa uttrycks i CRC-tumörceller, nämligen CEACAM5, KLK6, SLC35D3 och MUC2, och en, POSTN, uttrycks i tumörassocierade fibroblaster. Ingen av generna uttrycks i immunceller vilket gör dem lämpliga för analys av RNA extraherat från lymfkörtelprover. 18S rRNA analyseras för normalisering och som positiv kontroll.

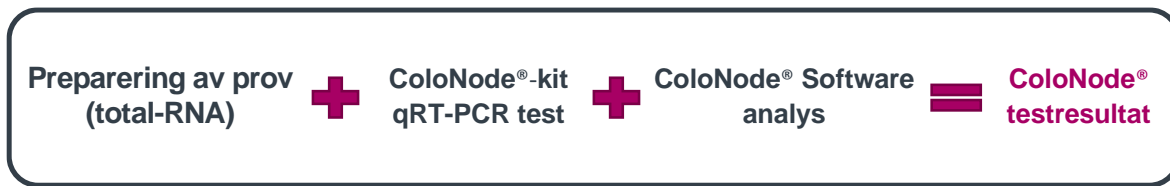
Information om målgenerna:

- CEACAM5 protein är en sedan länge etablerad tumörmarkör för adenocarcinom i kolon och rektum och används främst som blodtest för postoperativ uppföljning.⁵ CEACAM5 uttrycks i epitelceller i tjocktarmen och dess uttryck bibehålls i CRC.^{5,6} CEACAM5 mRNA uttrycks i höga nivåer i tumörceller.^{7,8} CEACAM5 mRNA visade sig vara överlägsen för detektion av spridda tumörceller i lymfkörtlar hos CRC-patienter jämfört med rutinmetoden (mikroskopisk undersökning av hematoxylin och eosinfärgade snitt av lymfkörtelvävnad).⁷⁻⁹ CEACAM5-mRNA-nivån är proportionell mot antalet spridda tumörceller, och höga nivåer av CEACAM5-mRNA i lymfkörteln är en indikator för dålig prognos.⁶⁻⁸ CEACAM5-mRNA kan, när det analyseras i kombination med mRNA för de fyra biomarkörerna KLK6, SLC35D3, POSTN och MUC2, identifiera CRC-patienter med risk för återfall med högre känslighet än rutinmetoden och tillåter allokering av CRC-patienter till olika riskgrupper.¹⁰
- KLK6 tillhör genfamiljen kallikrein-relaterade serinproteaser. Flera av dessa är felreglerade vid malignitet. De spelar roll vid reglering av celltillväxt, angiogenes, invasion och metastasering.¹¹ KLK6 mRNA har identifierades som en lovande progressionsbiomarkör för CRC. KLK6 mRNA uttrycks ektopiskt i CRC-tumörceller, och påvisande av KLK6 mRNA i lymfkörtlar är korrelerat till dålig prognos.^{10,12}
- SLC35D3 uttrycks i tumörceller men har ett annat uttrycksmönster än de för CEACAM5, MUC2 och KLK6.¹⁰ Uttryck av SLC35D3 i lymfkörtlar hos CRC-patienter är associerat med dålig prognos.¹⁰
- POSTN uttrycks i fibroblaster och i förhöjda nivåer i stroma runt cancercellerna vid CRC. Nivån av POSTN i stroma i såväl primärtumören som i lymfkörtlar hos CRC patienter är associerad med dålig prognos.^{10,13}
- MUC2 är det kvantitativt dominerande mucinet i slemskiktet som täcker tjock- och ändtarmens epitel. 10–20 % av CRC-tumörerna är mucinösa, och dessa har visat sig vara associerade med bättre prognos än adenokarcinom i allmänhet.¹⁴ Höga kvoter av MUC2mRNA:CEACAM5mRNA i lymfkörtlar hos CRC-patienter är associerad med god prognos.^{8,10}
- 18S rRNA används för beräkning av uttrycksnivåerna av biomarkör-mRNA. 18S rRNA har visat sig vara relativt stabilt uttryckt i lymfocyter och tarmepitelceller.^{15,16}

ColoNode[®]-kitet detekterar alla fem biomarkörernas mRNA och 18S rRNA med samma effektivitet i RNA extraherat från frusen lymfkörtelvävnad som från formalinfixerad, paraffinbäddad lymfkörtelvävnad.⁹

1.3 Analysprincip

ColoNode[®]-kitet är en dubbelt 3-plex, enstegs, realtids, qRT-PCR-test för analys av expressionsnivåer av biomarkör-mRNA. Den är designad och utvecklad för QuantStudio[™] 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

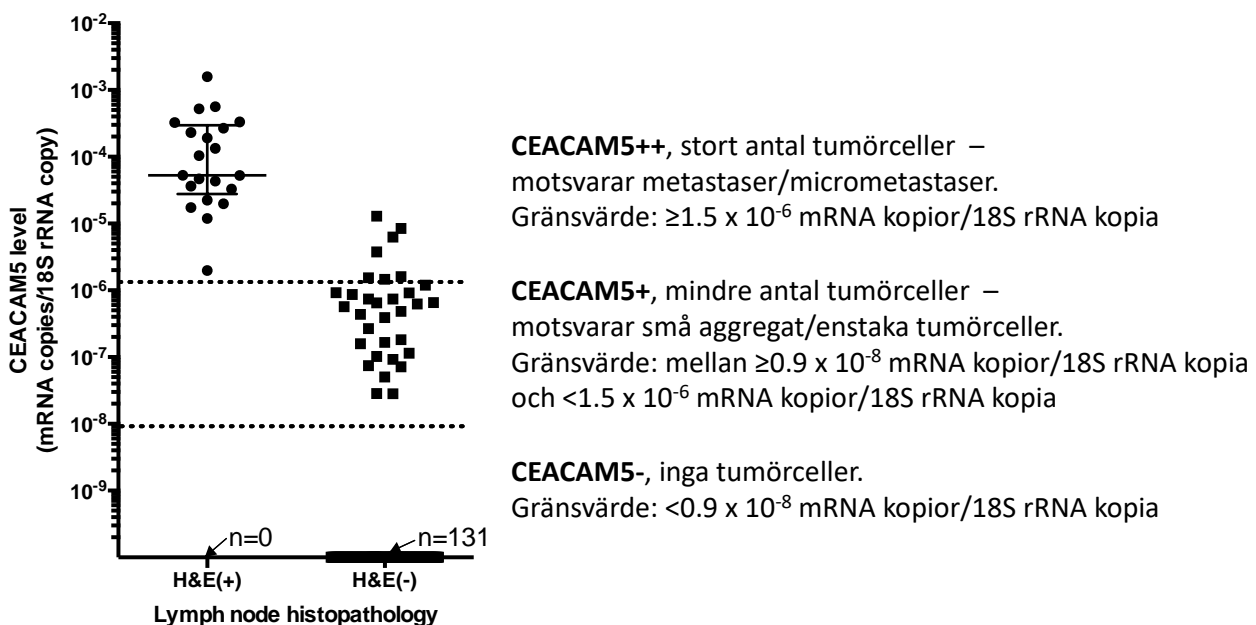


Figur 1. Översikt över ColoNode[®]-proceduren

I enstegs qRT-PCR-reaktionen sker både omvänd transkription av RNA till cDNA och PCR-amplifiering i samma reaktionsblandning där alla nödvändiga reagens tillsatts från början. Det är möjligt genom att använda enzymet *Tth DNA-polymeras*, som fungerar både som ett omvänt transkriptas och ett DNA-polymeras. På så sätt minskar man risken för tillförsel av kontaminerande ämnen.

Utgångsmaterial är total-RNA extraherat från lymfkörtelvävnad. De fem biomarkör-mRNA och 18S rRNA transkriberas omvänt till cDNA med specifika 3'-primrar som binder till mRNA för respektive biomarkör eller 18S rRNA och producerar specifika cDNA. I amplifieringssteget används ett 5'- och 3'-primerpar, som är komplementärt till en sträng vardera av de fem biomarkörernas mRNA och en biomarkör-mRNA-specifik "probe" som binder till den sträng av cDNA:t som som amplifierats. "Proben" är märkt med ett fluorescerande reporterfärgämne vid 5'-ändan och ett "quencherfärgämne" vid 3'-ändan som förhindrar fluorescensemission från den intakta "proben". Under amplifieringen kommer *Tth-DNA-polymeras* att klyva "proben", som är bunden till cDNA och frigöra det fluorescerande reporterfärgämnet. Fluorescensintensiteten ökar därvid för varje PCR-cykel som övervakas i realtid. När intensiteten av fluorescenssignalen når ett fördefinierat tröskelvärde, räknas antalet PCR-cykler som krävs för att nå tröskelvärdet. Antalet PCR-cykler som krävs för att nå tröskeln kallas tröskelvärde (ct) och är ett mått på mängden RNA i provet.

Rådata från en qRT-PCR-körning med ColoNode[®]-kitet överförs därefter från QuantStudio[™] 5 Real-Time PCR-systemet och analyseras av ColoNode[®]-mjukvaran, vilket ger tumörcelldetektion beräknad enligt beskrivning i referens 8 och uppskattning av tumöraggressivitet beräknad enligt den formel som anges i referens 10. Formeln tillämpas på den lymfkörtel som har högsta CEACAM5-mRNA-nivån (kopior/18S rRNA kopia). För varje prov anges vidare medelkoncentrationen i kopior/ μ L för de fem biomarkörernas mRNA och för 18S rRNA.



Figur 2. Gränsvärden för CEACAM5-nivåer. Varje prick representerar en lymfkörtel. CEACAM5 mRNA-nivån enligt ColoNode[®] har jämförts med rutinhistopatologi (H&E) på lymfkörtelsnitt som ligger direkt intill varandra. Data från referens 9.

1.4 Design

Varje kit är avsett för analys av lymfkörtlar från endast en patient och högst 20 körtlar. ColoNode®-kitet utför omvänd transkription, amplifiering och kvantifiering av mRNA med qRT-PCR med hjälp av två olika 3-plex reaktionsblandningar som körs parallellt. Kitet innehåller två "mastermixar" som inkluderar primrar och prober för tre av biomarkörerna i varje blandning. Båda "mastermixarna" innehåller också standardprover (STD), som utgör en blandning av definierade RNA kopekoncentrationer av 3 olika biomarkörer i var och en. qRT-PCR körningen med kopiestandarderna genererar standardkurvor för alla sex biomarkörerna, vilket möjliggör bestämning av koncentrationen av varje biomarkör i lymfkörtelprover från CRC patienter uttryckt som mRNA-kopior/ μL . Slutligen innehåller kitet två "no template"-kontroller (NTC) för de två 3-plex-analyserna. NTC, STD och okända lymfkörtelprover analyseras alla i duplikat.

För att undvika amplifiering av genomiskt DNA är 5'- och 3'-primrarna lokaliserade till olika exoner och den fluorokrommärkta "proben" lokaliserad över gränsen mellan de två exonerna. Tre olika fluorescensfärgämnen (FAM™, VIC™, NED™) används för att utföra kvantifiering av 3 biomarkörer i en enda reaktion. Tre av biomarkörerna mäts i den vänstra halvan av plattan och 2 av biomarkörerna och 18S rRNA mäts i den högra halvan. Carboxy-X-rhodamine (ROX) används som referensfärg för normalisering av fluorescenssignalerna i qRT-PCR körningar.

qRT-PCR-körningar med RNA-kopiestandarderna fungerar som kontroller av ColoNode®-kitets prestanda. NTC för varje mastermix fungerar som kontroll för kontaminering. qRT-PCR-körningarna för 18S rRNA i okända prover fungerar som en kvalitetskontroll av analyserat RNA och för beräkning av mRNA-nivåer.

OBS! Prover med 18S rRNA-koncentrationer under 10^8 kopior/ μL bör tolkas med stor försiktighet på grund av risken för falskt negativa resultat. ColoNode®-mjukvaran varnar för prover med 18S rRNA-koncentrationer mindre än 10^8 kopior/ μL genom att markera dem som "Invalid".

2. Material och utrustning

2.1 Innehåll

ColoNode®-kitet innehåller färdigblandade reagens för analys av 20 okända prover av total-RNA-extrakt av lymfkörtlar.

Tabell 1. Innehåll i ColoNode®-kit

Reagens	Rörmärkning	Antal rör	Färg på locket	Volym ($\mu\text{L}/\text{rör}$)	Lagrings-temperatur
Mastermix för system 1	ColoNode® Mastermix 1	1	Grön	790	-18°C/-25°C
Mastermix för system 2	ColoNode® Mastermix 2	1	Blå	790	-18°C/-25°C
Standarder (STD) för system 1	ColoNode® Standard 1 rör A, rör B, rör C	3	Grön	5	-18°C/-25°C
Standarder (STD) för system 2	ColoNode® Standard 2 rör D, rör E, rör F	3	Blå	5	-18°C/25°C
Manganacetat (25 mM)	Manganlösning	1	Vit	350	-18°C/25°C
"No template Control" (NTC)	Negativ kontroll	1	Grå	20	-18°C/-25°C

Notera! Maximalt 20 lymfkörtelprover kan analyseras av kitet. Använd ytterligare kit om fler än 20 lymfkörtlar behöver analyseras och kombinera resultaten. En tumör aggressivitet faktor kommer att ges för varje ColoNode®-analys. Den högsta tumör aggressivitet faktorn från analyserna bör då representera resultatet för patienten. Kitet ska användas för analys av endast en patient.

2.2 Material som krävs men som inte tillhandahålls

Allmän laboratorieutrustning

Följande allmänna laboratorieutrustning krävs för att utföra ColoNode®-kit analys:

- Vortex
- Pipetter (intervall 0,5-10 μL , 10-100 μL och 100-1000 μL)
- Bordscentrifug med rotor för 1,5-2 ml rör
- En centrifug med rotor för 96-brunnars PCR-plattor
- Ett RNase-fritt arbetsområde

- Isbad för upptining och hantering av provrören innan analys

All laboratorieutrustning ska installeras, kalibreras, användas och underhållas enligt tillverkarens instruktioner och rekommendationer.

Allmänna laborieförbrukningsvaror och reagens

Följande allmänna laborieförbrukningsartiklar krävs för att utföra ColoNode®-kit analys:

- 1,5 ml rör för PCR-användning
- Pipettspetsar med aerosolbarriär för PCR-användning
- Sterila engångshandskar utan puder

Rekommenderad specialutrustning och förbrukningsmaterial

- QuantStudio™ 5 realtids-PCR-system med block för 0,2 ml, 96-brunnars plattor (Standardblock, katalog #A28139, Applied Biosystems). Installation, kalibrering och underhåll ska utföras enligt tillverkarens instruktioner och rekommendationer.
- Utrustning för mätning av RNA-koncentration och kvalitet
- 96-brunnars platta och plasthölje (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate med streckkod och optisk självhäftande film (katalog #4314320 för Quant Studio™ 5, Applied Biosystems).
- Applikator för att försluta plastfilmen tätt till 96-brunnars plattan (MicroAmp™ Adhesive Film Applicator, katalog #4333183, Applied Biosystems)
- RNas-fritt vatten för spädning av prover med för höga RNA-koncentrationer, gärna med RNas-hämmare

2.3 Programvara

- QuantStudio™ 5 Design- och analysprogramvara för qRT-PCR-analys
- ColoNode®-programvara för analys av ColoNode®-kit qRT-PCR-rådata från Quant Studio-mjukvaran. För att hitta programvaran gå in på www.colonode.se och använd inloggningsuppgifterna som finns på följesedel.

2.4 Nedladdningar

Information som finns att ladda ner från www.colonode.se är:

- Bruksanvisning för ColoNode®-kit (IFU)
- Mall för inställning av en ColoNode®-kit qRT-PCR-körning på QuantStudio™ 5
- ColoNode® kemikalieinformation och säkerhetsblad

3. Förvaringskrav

- ColoNode®-kit-reagenserna är stabila fram till utgångsdatumet om de förvaras och hanteras enligt beskrivningen i denna bruksanvisning
- Använd inte kitet efter utgångsdatum
- Blanda inte kitkomponenter från samma eller olika partinummer
- Satsen är endast avsedd för engångsbruk
- Undvik nerfrysning och upptining
- Förvara ColoNode®-kit vid -18°C/-25°C

4. Försiktighetsåtgärder och säkerhet

- En analys med ColoNode®-kitet ska utföras enligt denna bruksanvisning
- Avvikelse från denna bruksanvisning kan äventyra prestanda och resultat
- Följ instruktionerna när du flyttar resultaten från QuantStudio™ 5, annars kan ColoNode Software-resultaten äventyras
- Slå inte ihop reagenser mellan kit som har olika lotnummer
- Använd inte skadade rör
- ColoNode®-kitet innehåller inga komponenter som är farliga vid de koncentrationer de förekommer i kitet. För mer information läs ColoNode® kemikalieinformation och säkerhetsdatablad som finns på vår hemsida (www.colonode.se).
- Användningen av denna produkt bör begränsas till personal med kvalifikationer i hantering av RNA och realtids-PCR-analys.
- Använd alltid laboratorierock och puderfria engångshandskar när du arbetar med ColoNode®-kit

- Frysta komponenter bör tinas fullständigt på is
- Alla reagenser ska förvaras på is under själva analysproceduren
- Avfallshantering av satskomponenter bör ske i enlighet med nationella säkerhetsriktlinjer för biologiska risker, nationella, federala, statliga och lokala föreskrifter
- Undvik mikrobiell kontaminering och förhindra introduktion av RNaser i kitkomponenter och prover
- Det rekommenderas starkt att hålla strikt åtskillnad vid beredning av ColoNode®-mastermix, RNA-prover och qRT-PCR-körningar i laboratoriet för att undvika korskontaminering. Dessutom bör all laboratorieutrustning vara dedikerad till varje område och inte flyttas mellan de olika arbetsområdena. Handskar bör bytas mellan de olika stegen.
- Kassera alla använda 96-brunnars plattor omedelbart efter qRT-PCR-körningen utan att öppna förseglingen för att undvika korskontaminering
- Håll arbetsområdena rena och fria från RNaser
- Använd sterila pipettspetsar med aerosolbarriärer och byt spets mellan varje prov för att förhindra korskontaminering mellan proverna
- ColoNode®-kitet innehåller inga smittsamma ämnen eller medel som kan orsaka sjukdomar hos människor eller djur

5. Begränsningar

ColoNode®-kitet:

- Är utvecklat för analys av lymfkörtelvävnad från CRC-patienter
- Resultaten kan påverkas om det RNA som skall analyseras avviker från rekommendationerna i denna bruksanvisning med avseende på kvalitet och/eller koncentration
- Kommer endast att mäta de sex beskrivna biomarkörerna
- Maximalt 20 lymfkörtelprover kan analyseras per kit
- Ett kit skall användas för analys av lymfkörtlar från en patient eftersom tumörens aggressivitet baseras på biomarkörprofilen för den lymfkörtel som har den högsta CEACAM5 mRNA-nivån och den ju är olika för olika patienter

6. Provkrav

ColoNode®-kitet skall användas för analys av total-RNA extrakt. Renhet och koncentration av det RNA som skall analyseras är avgörande för pålitliga resultat. Det är klokt att spara extraherat RNA tills resultat av analysen hunnit fastställas så att det finns möjlighet för omkörning om exempelvis dubbelproven inte stämmer eller 18S rRNA nivån i provet är för låg.

6.1 Prover

ColoNode®-kitets prestanda har validerats på total-RNA extraherat från obehandlade frysta halva lymfkörtlar från CRC-patienter och från 80 µm vävnadssnitt av formalinfixerade, paraffininbäddade lymfkörtlar från CRC-patienter (referens 9).

6.2 Homogenisering och RNA-extraktion

För stora lymfkörtelvävnadsvolym, såsom halva lymfkörtlar, obehandlade och infrusna eller formalinfixerade, är första steget att homogenisera lymfkörtelvävnaden genom att använda en metod som ger en homogen lösning av hela lymfkörtelvävnadsprovet. I andra steget används den homogena lösningen av för extraktion av total-RNA. Homogeniseringssteget krävs inte för total-RNA extraktion från mindre lymfkörtelvävnadsvolym som snitt av formalinfixerad, paraffininbäddad lymfkörtelvävnad. Total-RNA-extraktion bör utföras enligt bruksanvisningen från tillverkaren vars kit används.

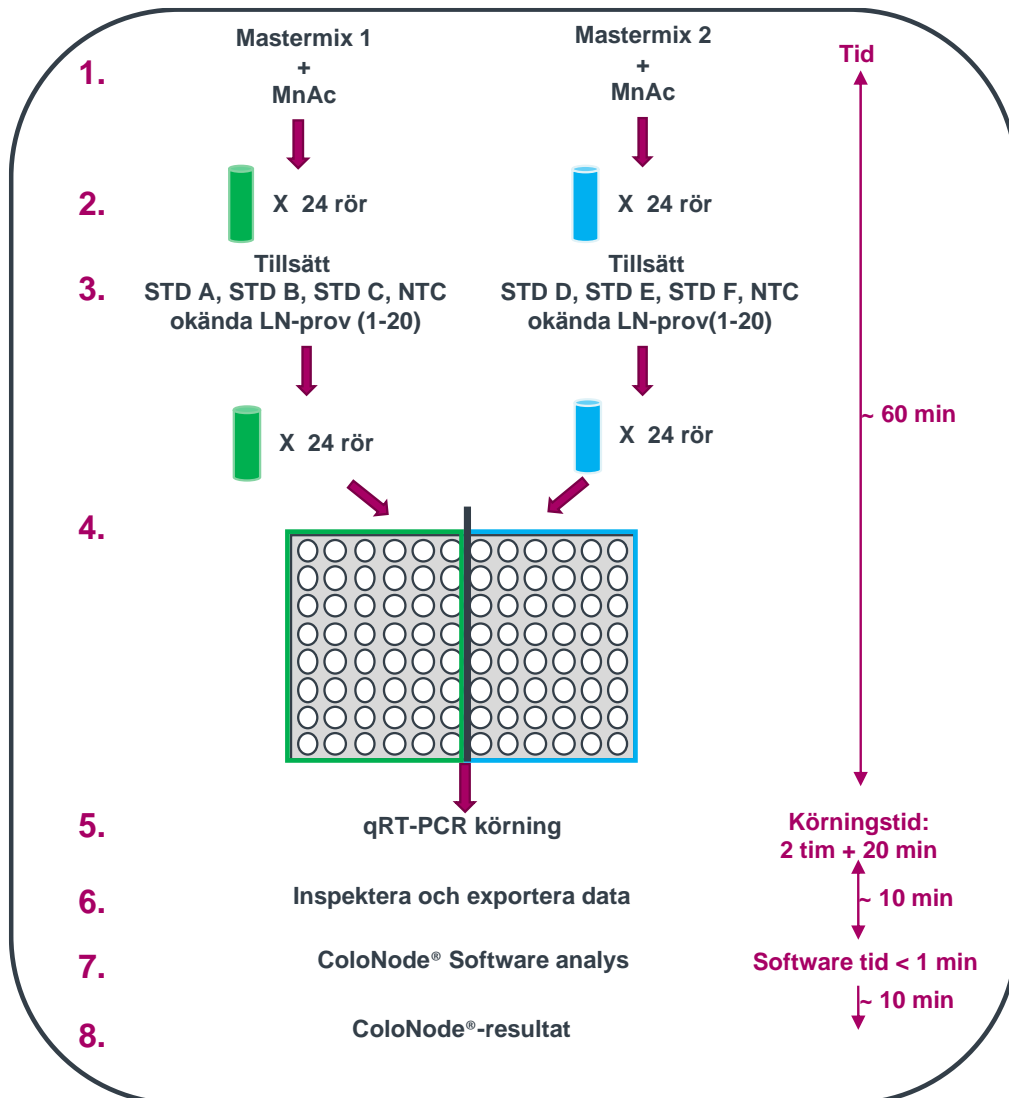
Rekommendationer för extraktion av RNA:

- För obehandlade frysta lymfkörtlar: extrahera totalt RNA genom att använda "acid-guanidine-phenol-chloroform" metoden¹⁷
- För formalinfixerade lymfkörtlar: extrahera total-RNA med hjälp av Roche Highpure FFPE RNA-isoleringskit (katalognummer 06650775001, Roche) Kan användas för både större volymer av icke-paraffininbäddad vävnad och för större volymer av paraffininbäddade snitt. För tunna snitt kan, RNeasy DSP FFPE Kit (Katalognummer: 73604, Qiagen) också användas.

6.3 RNA-renhet och koncentration

Koncentrationen av total-RNA i prover bör bestämmas genom att mäta optisk densitet vid 260 nm (OD260), och renheten uppskattas som kvoten mellan OD260/OD280, t.ex. genom att använda ett NanoDrop-instrument. Koncentrationen av total-RNA bör ligga inom intervallet 10 –1200 ng/μl. Späd ut total-RNA så att det hamnar inom intervallet. Koncentrationer mellan 500 – 1000 ng/μl är att föredra. *NOTERA! Spädning är endast nödvändig om koncentrationen är > 1200 ng/μl.* Använd RNAsfritt vatten för utspädning, gärna med RNas-inhibitor. RNA-prover bör vara fria från potentiella PCR-hämmande faktorer. OD260/OD280-kvoten bör vara >1,8.

7. Bruksanvisning



Figur 3. 1) Tillsätt MnAc-lösning till mastermixrören för system 1 och 2; 2) Alikvotera var och en av de två MnAc-innehållande masterblandningarna till 24 märkta enligt figur 4; 3) Tillsätt RNA till respektive rör, dvs 3 standardprover (STD) unika för system 1 och system 2 (rör A, B, C respektive D, E, F), 1 negativ kontroll (NTC) och 20 okända lymfkörtelprover per mastermix, 4) Fördela från rören till en platta med 96 brunnar och placera proverna i de positioner som visas i figur 5; 5) Kör plattan i qRT-PCR-instrumentet; 6) Inspektera qRT-PCR-körningen och exportera data från instrumentdatorn; 7) Använd den exporterade filen som indata för ColoNode®-programvaran och analysera data, och 8) Ta emot ColoNode®-resultat.

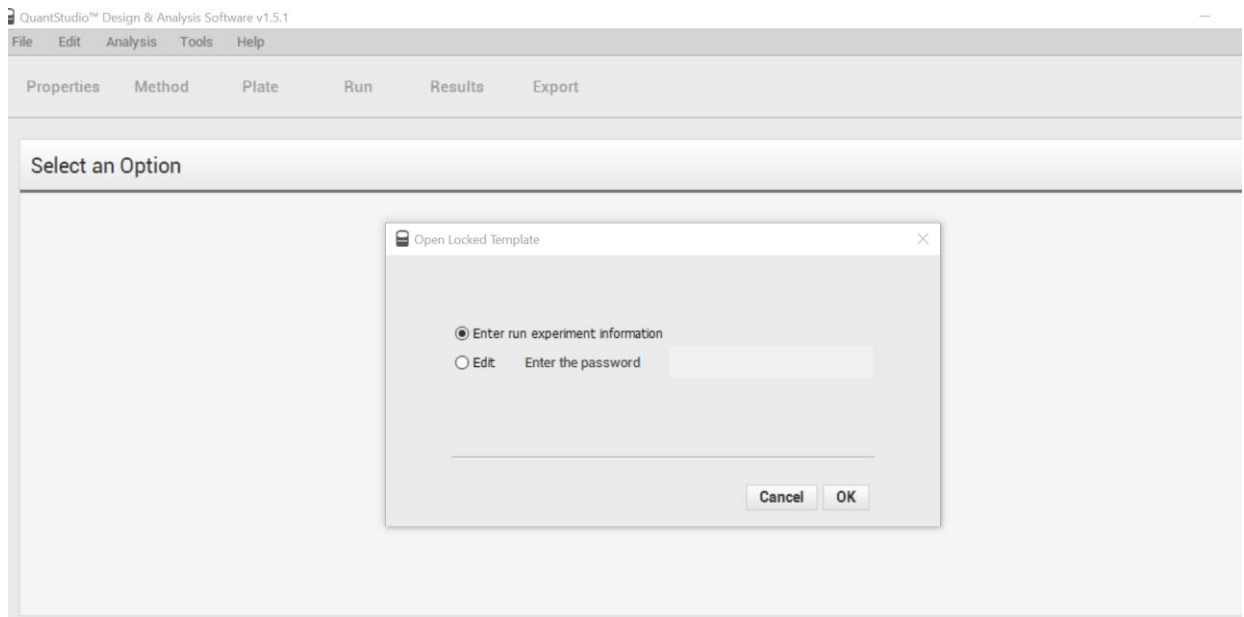
7.1 Riktlinjer för att utföra ColoNode®-kit analyser

- Utför alla steg på is
- Använd sterila engångsartiklar i plast och sterila, RNase-fria engångspetsar och rör

- Bär puderfria engångshandskar när du hanterat reagenser och RNA-prover för att förhindra RNase-kontamination från huden. Byt handskar ofta.
- Använd alltid lämpliga mikrobiologiska aseptiska tekniker när du arbetar med RNA
- Arbeta i ett RNase-fritt område

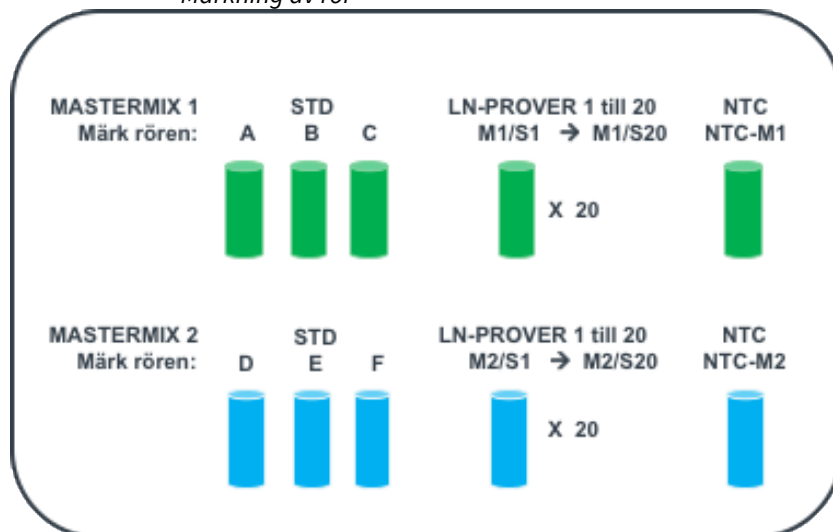
7.2 Schema för märkning och pipettering

1. Ladda ner mallen för qRT-PCR-körningen från www.colonode.se på ett USB-minne eller direkt på PC-datorn kopplad till QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
2. Gör en kopia av datafilen med mallen och ge den en patient specifik kod som namn. (Du behöver göra en kopia för att kunna namnge filen eftersom mallen är låst.)
3. Öppna kopian som du namngett med patient unik kod och tryck OK för att fortsätta.



4. Under fliken **PROPERTIES** i fönstret **"Experiment properties"** skriv in den patientunika koden vid **"Name"**, om så önskas skriv in även användare under **"User name"**, och spara filen.
5. Förbered 24 RNase-fria, 1,5 ml rör för var och en av de två mastermixarna, grön för system 1 och blå för system 2. Märk rören enligt beskrivningen i Figur 4: ett rör per RNA-standardkoncentration (rör STD A, B, C eller STD D, E, F), två rör per okänt RNA-prov som ska analyseras, ett för varje mastermix (M1/S1 till M1/S20 respektive M2/S1 till M2/S20) och NTC-M1 och NTC-M2. För en hel platta bör du alltså ha totalt 48 rör, 24 rör/mastermix (Figur 4).

Märkning av rör



Figur 4. För varje mastermix: Märk rör för 1 NTC (NTC-M1, NTC-M2), 3 STD-koncentrationer (A, B, C respektive D, E, F) och 20 okända lymfkörtelprover (M1/S1) till M1/S20 respektive M2/S1 till M2/S20), dvs totalt 24 rör/mastermix och 48 rör för hela qRT-PCR-körningen.

6. Tina alla reagensrör och förvara dem på is (Mastermix 1 och Mastermix 2, MnAc-lösning, NTC och STD för system 1 och 2). Tina dina prover och förvara dem på is.
7. När de tinats, vänd alla rör upp och ner ett par gånger. Centrifugera kort i en bordscentrifug före användning för att få ner hela reagensvolymen i botten av röret.
8. Aktivera masterblandningarna för system 1 och system 2 genom att tillsätta 165 µL MnAc-lösning per mastermixrör. Vortexa rören kort (~5 sek.) och centrifugera ner lösningen.
9. Alikvotera 37 µL av aktiverad mastermixlösning till de 24 rören märkta för system 1 (grön) respektive system 2 (blå). Håll rören på is.
10. Tillsätt 3 µL STD eller 3 µL okända RNA-prover eller 3 µL NTC till de märkta rören med aktiverad Mastermix 1 och Mastermix 2. Vortexa kort (~5 sek.) och centrifugera ner lösningen.
11. Fördela volymen från varje rör med aktiverad mastermix + RNA genom att pipettera 19 µL i 2 brunnar i 96-brunnars qRT-PCR-plattan enligt schemat som visas i Figur 5. Se till att proverna pipetteras i rätt brunnar. Om du har färre än 20 lymfkörtelprover, lämna de brunnar som inte behövs för dina prover tomma. Negativa kontroller (NTC) ska alltid vara i positionerna som visas i Figur 5, d.v.s. NTC-M1 i brunnarna H5 och H6 och NTC-M2 i brunnarna H11 och H12. Om du har fler än 20 lymfkörtelprover från en patient, följ instruktionerna vid "Notera" på sidan 5 i sektion 2.1.

PLACERING AV PROVERNA I 96-HÅLSPLATTAN

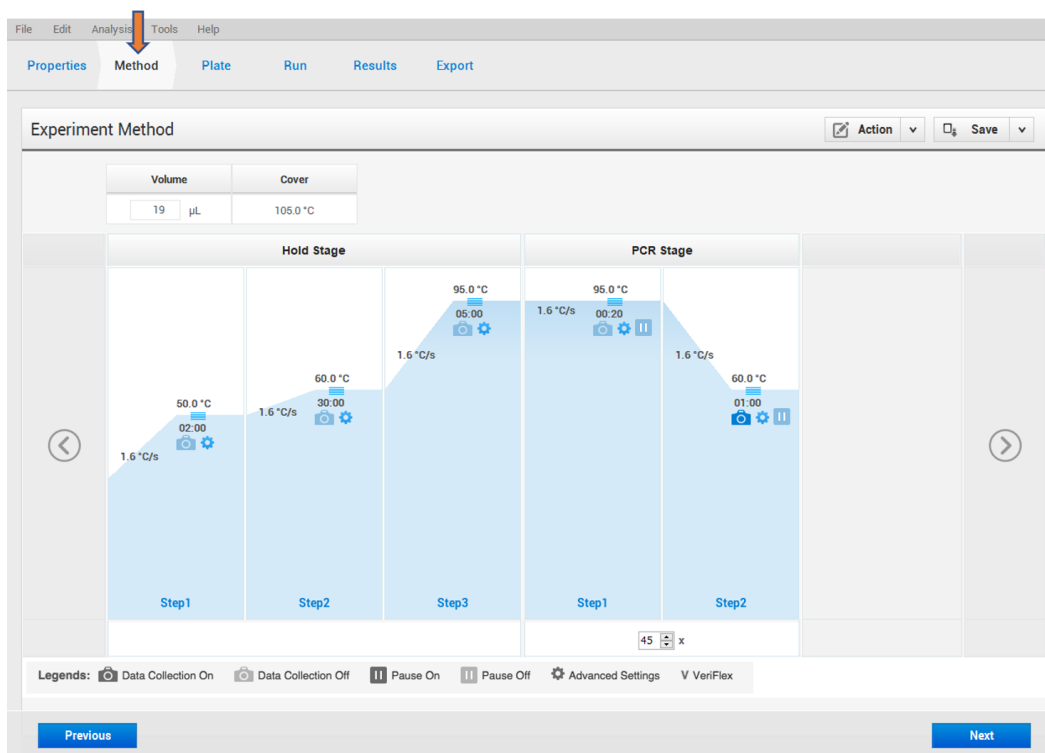
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD 1 Rör A	STD 1 Rör A	STD 1 Rör B	STD 1 Rör B	STD 1 Rör C	STD 1 Rör C	STD 2 Rör D	STD 2 Rör D	STD 2 Rör E	STD 2 Rör E	STD 2 Rör F	STD 2 Rör F
B	M1/S1	M1/S1	M1/S2	M1/S2	M1/S3	M1/S3	M2/S1	M2/S1	M2/S2	M2/S2	M2/S3	M2/S3
C	M1/S4	M1/S4	M1/S5	M1/S5	M1/S6	M1/S6	M2/S4	M2/S4	M2/S5	M2/S5	M2/S6	M2/S6
D	M1/S7	M1/S7	M1/S8	M1/S8	M1/S9	M1/S9	M2/S7	M2/S7	M2/S8	M2/S8	M2/S9	M2/S9
E	M1/S10	M1/S10	M1/S11	M1/S11	M1/S12	M1/S12	M2/S10	M2/S10	M2/S11	M2/S11	M2/S12	M2/S12
F	M1/S13	M1/S13	M1/S14	M1/S14	M1/S15	M1/S15	M2/S13	M2/S13	M2/S14	M2/S14	M2/S15	M2/S15
G	M1/S16	M1/S16	M1/S17	M1/S17	M1/S18	M1/S18	M2/S16	M2/S16	M2/S17	M2/S17	M2/S18	M2/S18
H	M1/S19	M1/S19	M1/S20	M1/S20	NTC-M1	NTC-M1	M2/S19	M2/S19	M2/S20	M2/S20	NTC-M2	NTC-M2

← Grön: System 1, d.v.s. prover i Mastermix 1 (M1)
→ Blå: System 2, d.v.s. prover i Mastermix 2 (M2) →

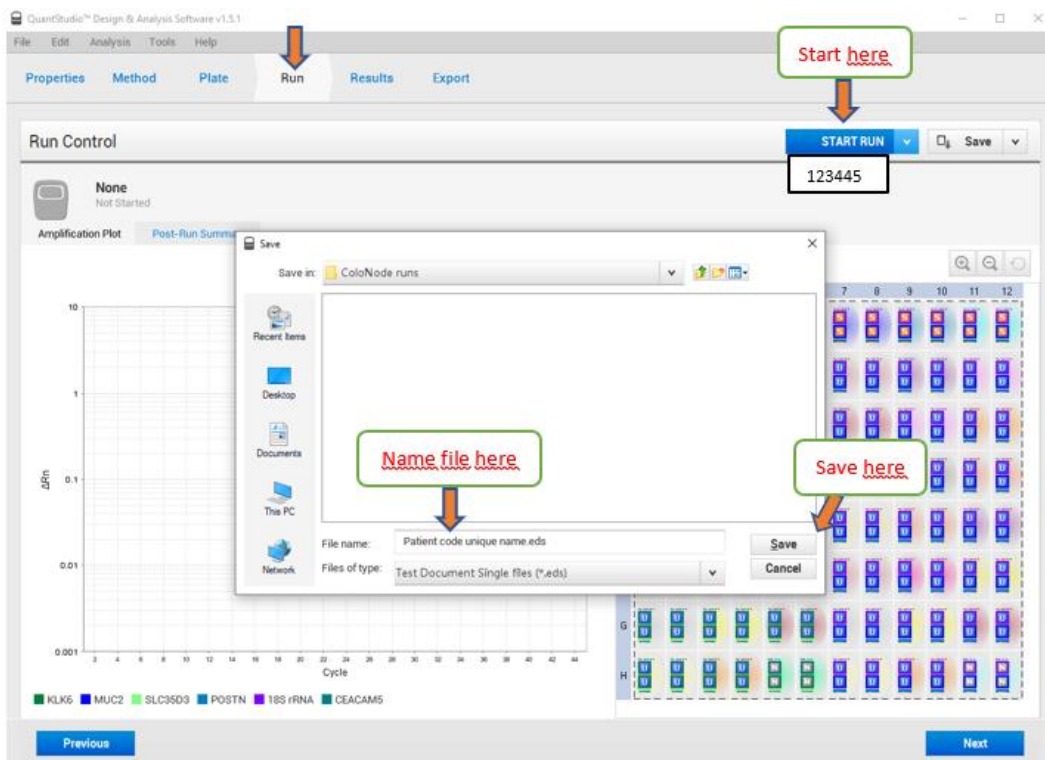
Figur 5. Provpositioner i 96-brunnars qRT-PCR-platta. På vänster sida (grön) späds proverna i mastermix 1 (M1) och analyseras för biomarkörerna i System 1, på höger sida (blå) späds proverna i mastermix 2 (M2) och analyseras för de två biomarkörerna i System 2 och 18S rRNA. STD1 = RNA-kopiestandard för System 1; STD 2 = RNA-kopiestandard för System 2; NOTERA! Varje lymfkörtel total-RNA-extraktprov analyseras i duplikat för System 1 (M1/S1 till M1/S20) respektive System 2 (M1/S1 till M2/S20); NTC-M1 = kontroll för system 1; NTC-M2 = kontroll för system 2.

12. Försegla plattan med en plastfilm enligt QuantStudio™ 5-manualen
13. Centrifugera 96-brunnars plattan kort i en bordscentrifug i 15 till 30 sekunder
14. Slå på strömmen till QuantStudio™ 5 instrumentet. (Det är viktigt att datorn är igång innan qRT-PCR instrumentets ström slås på).
15. Sätt 96-brunnars plattan i qRT-PCR-instrumentet

16. Gå till din sparade installationsfil (.edt). På den övre fliken, tryck på "**Method**" för att kontrollera att följande PCR-profil är installerad:



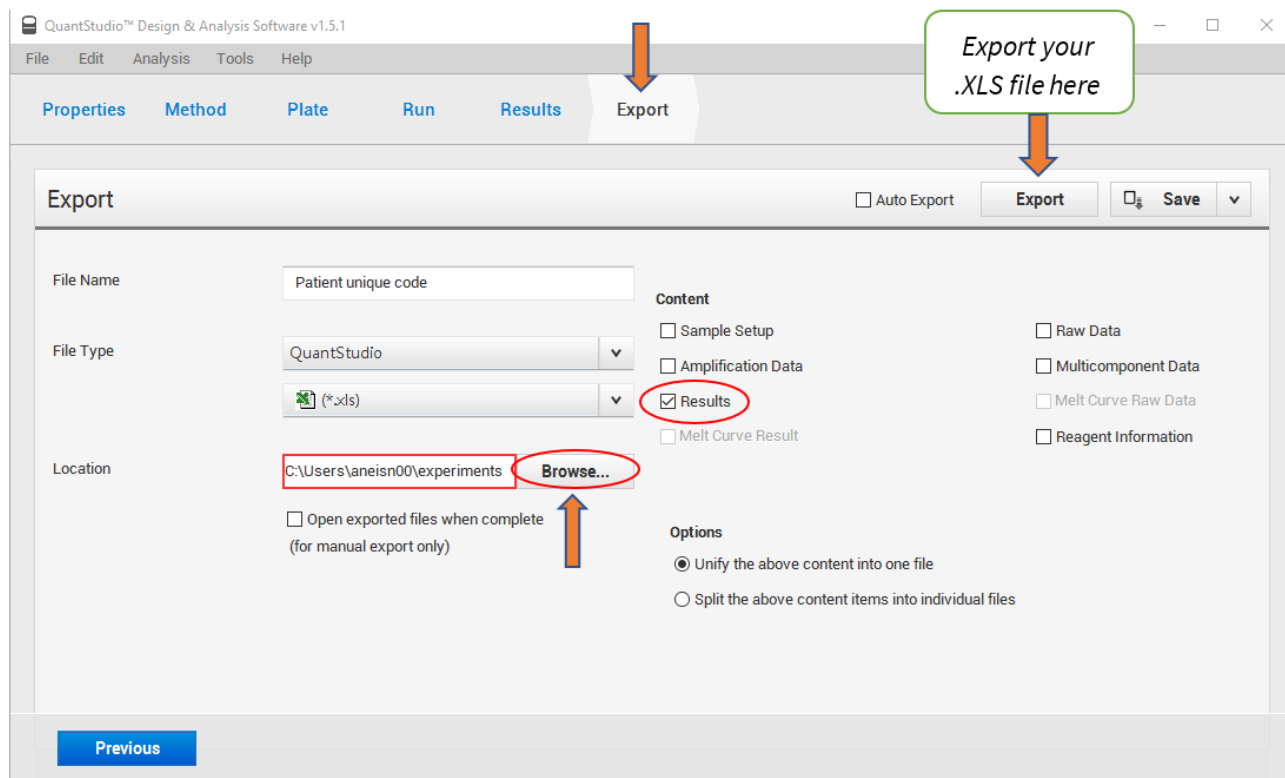
17. På den övre fliken tryck på "**Run**". Starta körningen genom att klicka på den blå knappen "**START RUN**", välj serienumret på QS5-instrumentet. Spara körningen med en patientunik kod (.eds) genom att trycka "**Save**" i rutan som kommer fram.



18. Körningen tar cirka 2 timmar och 20 minuter.

7.3 Avläsning av resultat från analysinstrument

1. När RT-PCR-körningen är klar, börja med att spara resultaten (= rådata).
2. Exportera Excel-filen (.xls) genom att:
 - På den övre fliken, tryck på **"Export"**
 - **Kontrollera att filnamnet finns där, annars fyll i det**
Under **"Content"**, markera **"Results"**
 - Bläddra till Excel-filens plats på datorn (visas i **"Location"**) genom att trycka på **"Browse"**
 - Tryck på **"Export"**



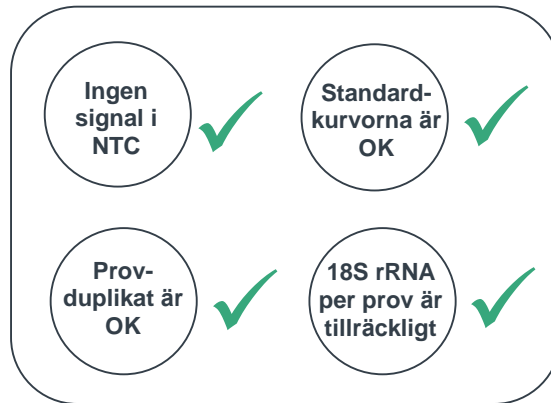
3. Spara en kopia av rådata-filen, för möjlighet att göra felsökning om det skulle behövas senare.
4. Överför den exporterade Excel-filen till en dator som är uppkopplad mot internet för åtkomst av programvaran ColoNode® på ColoNode®-kitets hemsida (www.colonode.se).

7.4 Resultatanalys med programvaran ColoNode® Software

Så här analyserar du resultaten med programvaran:

1. Logga in på ColoNode® Software genom att använda uppgifterna som finns på följesedel.
2. Ladda upp den exporterade Excel-filen (.xls) från steg 4 under 7.3 genom att trycka på **"Select file"** (svart knapp), fyll i lot-nummer och tryck på **"Upload file"** (blå knapp).
3. Tryck på **"Analyze file"** (turkos knapp). När beräkningarna är klara visas en grön ruta med texten: **"OK Analysis successful"**. Scrolla ner för att se **"COLONODE TEST RESULT SUMMARY"** med:
 - Sammanfattningen "Tumor cell detection in lymph nodes and tumor aggressiveness"
 - "Tumor cell detection": CEACAM5-nivåerna i de individuella lymfkörtlarna
 - "Concentration of biomarker mRNAs and 18S rRNA in copies/ μ L": koncentrationen av de olika biomarkörerna specificerat för de olika lymfkörtelekstrakten
 - "Quality control of Standard curve slopes and No Template Controls": sammanfattning av kvantitetskontrollerna
 Detaljer visas när man trycker på **"Information"**-knapparna.
4. Spara resultaten genom att trycka på den svarta knappen med **download**-symbol till höger om filnamnet. Alla resultat kommer då att sparas i en PDF-fil som innehåller sammanfattningen COLONODE TEST RESULT SUMMARY, CEACAM5-nivån för varje enskild lymfkörtel, koncentrationen av de sex biomarkörerna i varje enskilt lymfkörtelextrakt, sammanfattning av kvalitetskontroll av standard och NTC för de sex biomarkörerna, en lista med ct- och kvantitetvärden för varje qRT-PCR-körning samt resultat från kvalitetskontroll av samtliga qRT-PCR-körningar med okända prover och standard. Koncentrationen av de sex biomarkörerna i de enskilda lymfkörtelekstrakten kan även sparas och laddas ner som en Excel-fil genom att trycka på den gröna knappen med en Excel-symbol.

KONTROLLER SOM UTFÖRS AV COLONODE SOFTWARE



Så här tolkas kvalitetskontrollen:

✓ Resultat OK. Ingen ytterligare analys behöver göras.

! Tryck på "**information**"-knappen för dessa prover. Läs skälen till varningen och utvärdera om en omkörning behövs eller om resultaten fortfarande kan användas.

8. Betydelse av symboler som används på etiketter

IVD

In vitro diagnostik

LOT

Parti- eller lot-nummer

REF

Katalognummer



Utgångsdatum

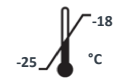


Bruksanvisning, finns på hemsidan

e-instructions



Tillverkare



Förvaringstemperatur



Ej avsedd för återanvändning



Conformité Européenne mark

9. Meddelande till köpare

Denna produkt tillverkades med NED™ Phosphoamidites och/eller VIC™ Phosphoramidites. Både NED™ och VIC™ är varumärken som tillhör Thermo Fisher Scientific Inc. MGB™, MGB Eclipse® och Eclipse® är varumärken som tillhör EllTechGroup® Inc.

10. Referenser

1. Chang GJ, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, Moyer VA. Lymph node evaluation and survival after curative resection of colon cancer: systematic review. J Natl Cancer Inst. 2007;99:433-441.

2. Iddings D, Bilchik A. The biologic significance of micrometastatic disease and sentinel lymph node technology on colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2007;96:671-677.
3. Nicastrì DG, Doucette JT, Godfrey TE, Hughes SJ. Is occult lymph node disease in colorectal cancer patients clinically significant? A review of the relevant literature. *J Mol Diagn*. 2007;9:563-571.
4. Hammarström S. Biomarker mRNAs as prognostic tools for lymph node analysis in colorectal cancer. *Biomark Med*. 2019;13:801-803.
5. Hammarström S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol*. 1999;9: 67-81.
6. Ohlsson L, Hammarström M-L, Israelsson A, Näslund L, Öberg Å, Lindmark G, Hammarström S. Biomarker selection for detection of occult tumour cells in lymph nodes of colorectal cancer patients using real-time quantitative RT-PCR. *Br J Cancer*. 2006;95:218-225.
7. Öberg Å, Lindmark G, Israelsson A, Hammarström S, Hammarström M-L. Detection of occult tumor cells in lymph nodes of colorectal cancer patients using real-time quantitative RT-PCR for CEA and CK20 mRNAs. *Int J Cancer*. 2004;111:101-110.
8. Ohlsson L, Israelsson A, Öberg Å, Palmqvist R, Stenlund H, Hammarström M-L, Hammarström S, Lindmark G. Lymph node CEA and MUC2 mRNA as useful predictors of outcome in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2012;130:1833-1843.
9. Olsson LM, Lindmark GE, Israelsson ACE, Korkocic D, Hammarström SG, Hammarström M-LKC. CEACAM5, KLK6, SLC35D3, POSTN and MUC2 mRNA analysis improves detection and allows characterization of tumor cells in lymph nodes of colon cancer patients. *Dis Colon Rectum*. 2021;64:1354-1363. doi: 10.1097/DCR.0000000000002151.
10. Olsson L, Hammarström M-L, Israelsson A, Lindmark G, Hammarström S. Allocating colorectal cancer patients to different risk categories by using a five-biomarker mRNA combination in lymph node analysis. *PLoS ONE*. 2020;15:e0229007.
11. Borgono C, Diamandis E. The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:876-890.
12. Ohlsson L, Lindmark G, Israelsson A, Palmqvist R, Öberg Å, Hammarström M-L, Hammarström S. Lymph node tissue kallikrein-related peptidase 6 mRNA – a progression marker for colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2012;107:150-157.
13. Oh HJ, Bae JM, Wen X-Y, Cho N-Y, Kim J-H, Kang GH. Overexpression of POSTN in tumor stroma is a poor prognostic indicator of colorectal cancer. *J Pathol Transl Med*. 2017;51:306-313.
14. Liu Q, Luo D, Li Q, Zhu J, Li X. Evaluating the effect of lymph node status on survival in large colon cancer. *Front Oncol*. 2018;8:602.
15. Bas A, Forsberg G, Hammarström S, Hammarström M-L. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, β -actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol*. 2004;59:566-573.
16. Fahlgrén A, Hammarström S, Danielsson Å, Hammarström M-L. Increased expression of antimicrobial peptides and lysozyme in colonic epithelial cells of patients with ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol*. 2003;31:90-101.
17. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987;162:156-159.

11. Förkortningar

CEACAM5, carcinoembryonalt antigen, carcinoembryonalt antigenrelaterad celladhesionsmolekyl 5
 CRC, kolorektal cancer
 Ct, tröskelvärde
 IFU, bruksanvisning
 KLK6, kallikrein-relaterat peptidas 6
 MUC2, mucin 2
 NTC, negativ kontroll
 OD, optisk densitet
 POSTN, periostin
 qRT-PCR, kvantitativ omvänd transkriptas-polymeraskedjereaktion
 ROX, karboxy-X-rodamin
 SLC35D3, bärarfamiljen för lösta ämnen 35 medlem D3
 STD, standard

12. Kontaktinformation

ColoNode®-kit och programvara tillverkas av **HiloProbe AB**, Tvistevägen 48C, Umeå, SE- 90736, Sverige.

För ytterligare information och support vänligen kontakta oss genom att skicka ett mail till info@colonode.se eller genom att ringa telefonnummer +46768216770.

Företaget HiloProbe AB har patent för ColoNode®-kitet.