

hepatomiR[®]

microRNA Biomarkers of Liver Function and Disease

hepatomiR[®]-Kit

Gebrauchsanweisung v4.1

Januar 2025



KT-031-HEP



DE

≡ Tabellen

5	Tabelle 1 Liste der im hepatomiR®-Kit enthaltenen microRNAs
6	Tabelle 2 Prognostische Leistungsmerkmale des hepatomiR®- p-Score für PHLF
13	Tabelle 3 Kompatible Blutentnahmeröhrchen
20	Tabelle 4 Wesentliche Komponenten
21	Tabelle 5 Liste nicht gelieferter Reagenzien
22	Tabelle 6 Plattenformat und PCR-Cycler
	Abbildungen
7	Abbildung 1 Übersicht der erforderli- chen Komponenten
8	Abbildung 2 Workflow
10	Abbildung 3 Reverse Transkription und qPCR Amplifikation
22	Abbildung 4 Workflow für die Vorbereitung von PPP
28	Abbildung 5 Layout der 96-Well- Platten und Pipettierschema
28	Abbildung 6 Layout der 384-Well-Platten und Pipettierschema

Weitere Informationen
und technische Hinweise
können unter www.tamirna.com/hepatomiR gefunden
werden

1 | Produktzusammenfassung

5	Verwendungszweck
7	Produktkomponenten
8	Workflow
9	Technologie
9	RNA-Isolation
9	Reverse Transkription und quantitative PCR
10	LNA-Technologie
10	Lagerung und Haltbarkeit
11	Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

2 | Präanalytik

13	Probenmatrix
13	Präanalytische Standardisierung
15	Lagerung und Haltbarkeit von Plasma, RNA und DNA
16	Arbeiten mit RNA
17	Qualitätskontrolle
17	RT-qPCR Kontrollen (Spike-Ins)
18	Hämolyse
18	RNA-Ausbeute

3 | Laborprotokoll

20	Wesentliche Komponenten
21	Verbrauchsmaterialien und Instrumente, die nicht von TamiRNA bereitgestellt werden
22	Plättchenarme Plasmasammlung
23	Laborprotokoll
23	RNA-Isolation
26	cDNA-Synthese
28	qPCR-Amplifikation
29	Datenanalyse
31	Fehlerbehebung
33	Verwandte Dienstleistungen
33	Verwandte Produkte
33	Weiterführende Literatur
34	Haftungsausschluss
34	Erläuterung der verwendeten Symbole
34	Vertriebspartner

Änderungshistorie

Datum	Revision	Details zur Änderung
Mai 2022	1.0	Erstellung der IFU
September 2023	2.0	Laborprotokoll Schritt 14
Januar 2024	3.0	Aktualisierte Liste der „nicht gelieferten Reagenzien“ (S. 21); Verbesserung des Laborprotokolls zur Reduzierung der Fehlerwahrscheinlichkeit (S. 23).
November 2024	4.0	Aktualisierung der Tabelle 6 (S. 22); Hinzufügung des qPCR-Setups mit ROX (S. 28); Aktualisierung der Abschnitte „Datenexport und Analyse“ (S. 30).
Jänner 2025	4.1	Korrektur der Deckelfarben (S. 20).

Verwendungszweck

Bestimmungsgemäße Verwendung

Das hepato**miR**[®]-Kit soll für die quantitative Analyse von drei humanen microRNAs, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-192-5p und hsa-miR-151a-5p (Tabelle 1) in humanen plättchenarmen Plasmaproben verwendet werden (Tabelle 1). Die hepato**miR**[®] Software berechnet und liefert einen Score („p-Score“), der als Surrogatparameter für die Leberfunktion verwendet werden kann. Der hepato**miR**[®]-p-Score liegt zwischen 0 und 1. Ein hoher p-Score deutet auf eine eingeschränkte Leberfunktion und ein höheres Risiko für postoperative Leberdysfunktion hin (siehe unten „sonstiger Verwendungszweck“).

≡ Tabelle 1

Liste der im hepato**miR**[®]-Kit
enthaltenen microRNAs

microRNAs, die mit dem hepato**miR**[®]-Kit gemessen wurden.

microRNA ID (miRbase v22)	miRbase-Zugangsnummer	microRNA-Sequenz
hsa-miR-122-5p	MIMAT0000421	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG
hsa-miR-192-5p	MIMAT0000222	CUGCCAAUCCAAGGUCACAG
hsa-miR-151a-5p	MIMAT0004697	UCGAGGAGCUACAGUCUAGU

Schlüsselpublikationen:

- Starlinger P, Hackl H, Pereyra D, Skalicky S, Geiger E, Finsterbusch M, Tamandl D, Brostjan C, Grünberger T, Hackl M, Assinger A. (2019). Predicting Postoperative Liver Dysfunction Based on Blood Derived MicroRNA Signatures. Hepatology. 2019 Jun;69(6):2636-2651. doi: 10.1002/hep.30572. Epub 2019 Apr 10

Definition der Patientenpopulation

Die Population, die zur Entwicklung von hepato**miR**[®] herangezogen wurde, umfasste sowohl Männer (69 %) als auch Frauen (31 %). Die Altersspanne lag zwischen 22 und 90 Jahren, der Median bei 65 Jahren. Drei Tumorentitäten waren in dieser Kohorte vertreten, nämlich hepatozelluläre (HCC) (20 %), cholangiozelluläre (CCC) (19 %) und metastasierte kolorektale Karzinome (mCRC) (41 %). Sonstige Tumorarten (9 %) und gutartige Tumore (5,5 %) waren ebenfalls vertreten.

Sonstiger Verwendungszweck

Der hepato**miR**[®]-p-Score hat sich als potenziell nützlich für die präoperative (Prä-OP) Bewertung der Leberfunktion bei PatientInnen erwiesen, die sich einer Leberoperation unterziehen. Zusammen mit anderen klinischen Parametern kann der hepato**miR**[®]-p-Score Aufschluss über das Risiko der postoperativen Leberdysfunktion (PHLF) geben, welche nach einer Teilresektion von Lebergewebe („Hepatektomie“) auftreten kann.

Der hepatomiR® Test kann bei PatientInnen angewandt werden, die eine partielle Leberresektion benötigen (z.B. zur Behandlung von primären oder metastasierenden Lebertumoren), und die aufgrund der Tumorgroße, -lokalisation, des allgemeinen Gesundheitszustands und gemäß herkömmlicher Leberfunktionsparameter für diesen Eingriff in Frage kommen. Der hepatomiR® Test kann nützlich sein:

- Um PatientInnen mit hohem PHLF-Risiko zu identifizieren, die wahrscheinlich nicht von einer Hepatektomie profitieren.
- Um PatientInnen mit geringem PHLF-Risiko zu identifizieren, die ohne Verzögerung operiert werden können.
- Um PatientInnen mit mittlerem PHLF-Risiko zu identifizieren, die für einen präoperativen Eingriff zur Verbesserung der Leberfunktion in Frage kommen.
- Um die Leberfunktion vor, während und nach dem Eingriff zu überwachen, mit dem Ziel, die Leberfunktion zu verbessern.

Weitere Anwendungsfälle für hepatomiR® sind: die Bewertung der Leberfunktion im Rahmen akuter oder chronischer Lebererkrankungen.

Diagnostische Leistung zur Prognose einer postoperativen Leberdysfunktion nach Hepatektomie

Starlinger et al. (Hepatology, Vol. 69, No. 6, 2019) analysierten retrospektiv den Nutzen des hepatomiR®-p-Score für die Prognose von PHLF bei 146 onkologischen Patienten mit HCC, CCC bzw. mCRC. Tabelle 2 fasst die beobachtete prognostische Leistung für PHLF für zwei Grenzwerte zusammen.

Tabelle 2 

Prognostische Leistungsmerkmale des hepatomiR®-p-Score für PHLF.

Cut-off	Odds Ratio	PPV	NPV	Sensitivität	Spezifität
p> 0,59	18,7	0,70	0,89	0,55	0,94
p> 0,68	19,7	0,83	0,85	0,34	0,98

Der hepatomiR® Test könnte daher den dringenden klinischen Bedarf an einem einfach durchzuführenden präoperativen Test zur Bewertung der Leberfunktion bei PatientInnen mit Lebertumoren insbesondere HCC, CCC und mCRC, decken und die Erholung der Leberfunktion nach einer Teilresektion vorhersagen. Dies ist entscheidend, um PatientInnen mit hohem Risiko für postoperative Leberdysfunktion zu identifizieren und entsprechende Risikominderungsmaßnahmen zu planen.

Produktkomponenten

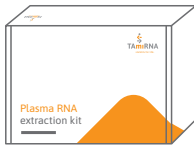
Die folgenden Komponenten werden für die Messung von 3 hepatomiRs und 5 Qualitätskontrollen in menschlichen plättchenarmen Plasmaproben benötigt:

- Plasma RNA Extraktions Kit
- hepatomiR® Chemistry Kit
- hepatomiR® 96- oder 384-Well qPCR-Platten (Primer-beschichtet)



Abbildung 1

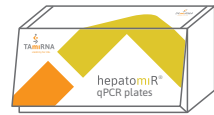
Übersicht der erforderlichen Komponenten



Plasma RNA
Extraktions Kit



hepatomiR®-Chemistry,
einschließlich Spike-ins, RT
Enzymen und Mastermix

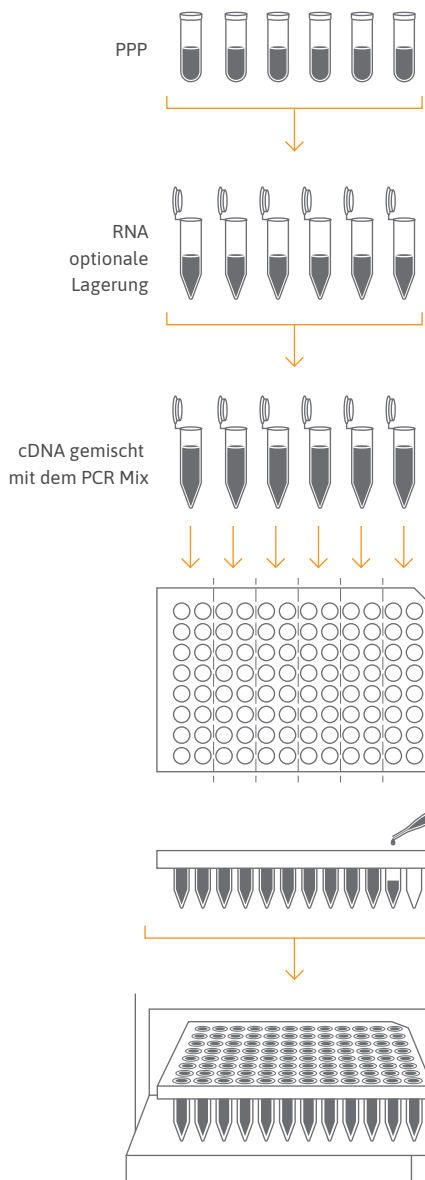


hepatomiR® 96- oder
384-Well qPCR Platten
(Primer-beschichtet)

Diese 3 Komponenten ermöglichen die Analyse von microRNAs in plättchenarmem Plasma innerhalb eines Tages.

Der gesamte Arbeitsablauf besteht aus fünf Hauptschritten, die in Abbildung 2 dargestellt sind:

1. RNA Extraktion
2. cDNA Synthese (Reverse Transkription)
3. Vorbereitung des PCR Mastermix
4. Real-time PCR Amplifikation
5. Datenanalyse



1 RNA Extraktion (1.5h)

Extrahieren Sie RNA mit dem Plasma RNA-Extraktionskit

2 cDNA Synthese (1.5h)

Synthetisieren Sie cDNA unter Verwendung des hepatomiR® Chemistry kits

3 Vorbereitung des PCR Mastermix

Mischen Sie die cDNA mit dem miGreen Mix und nukleasefreien Wasser

4 Real-time PCR Amplifikation (2.5h)

Verteilen Sie den PCR-Mix in die Vertiefungen der hepatomiR®-Platte und starten Sie den qPCR-Lauf

5 Datenanalyse

Exportieren Sie die Daten für die weitere Analyse.

Technologie

RNA-Isolation

Das Plasma RNA Extraktions Kit ermöglicht die Isolierung von microRNAs aus 200 µl Probenvolumen. Das Kit wurde entwickelt, um hochqualitative RNA in ausreichenden Mengen für die qPCR-Analyse mit dem heptomir® Chemistry-Kit zu isolieren. Das phenolfreie Protokoll verwendet Protokolle für die Probenlyse, RNA Extraktion, Reinigung und Elution die mittels Zentrifugation durchgeführt werden können. Im Zuge der Probenlyse wird RNA sowohl aus extrazellulären Vesikeln als auch aus Proteinkomplexen freigesetzt.

Der Workflow besteht aus 5 einfachen Schritten:

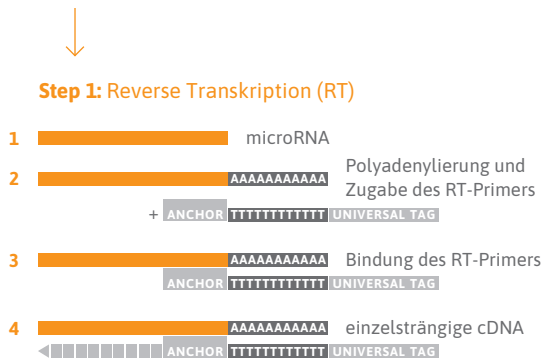
1. Lyse der Plasmaprobe
2. Fällung und Entfernung von Proteinen
3. Fällung von RNA mit Isopropanol und Säulenbeladung
4. Waschen
5. Elution

Im ersten Teil der RNA-Isolation werden Membranpartikel (z.B. extrazelluläre Vesikel) sowie Proteinkomplexe und RNase lysiert. Die Proteine werden ausgefällt, und der wässrige Überstand (einschließlich der RNA) wird zur Präzipitation der RNA mit Glykogen und Isopropanol gemischt. Diese Lösung wird auf eine Spin Column geladen, wo die RNA aufgrund ihrer Ladung gebunden wird. Dadurch werden microRNAs an die Säule gebunden, während die restlichen Proteine im Durchfluss entfernt oder auf der Oberseite des Säulenmaterials zurückgehalten werden. Die gebundene microRNA wird dann mit den bereitgestellten Waschpuffern gewaschen, um alle verbleibenden Verunreinigungen zu entfernen. Danach wird die gereinigte microRNA mit RNase-freiem Wasser eluiert.

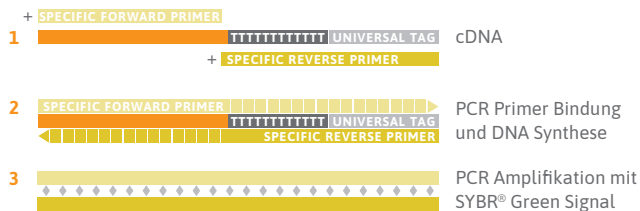
Reverse Transkription und real-time PCR Amplifikation

Im Zuge der universellen reversen Transkription (RT) werden, wie in Abbildung 3 (Schritt 1-2) dargestellt, alle kurzen RNAs (inklusive microRNAs) gleichzeitig in komplementäre cDNA umgewandelt werden. Dies ermöglicht im Anschluss einen parallelen quantitativen PCR-Nachweis (qPCR) verschiedener microRNA-Sequenzen in einer cDNA-Probe unter Verwendung der heptomir® qPCR Platten.

Die universelle RT wird erreicht, indem zunächst ein Poly-A-Schwanz an die reife microRNA angehängt wird (Schritt 1). Komplementäre cDNA wird unter Verwendung eines RT-Primers, bestehend aus einem randomisierten „3'Anchor“, oligo-dT, und universellem „Tag“, synthetisiert. Während der qPCR wird die cDNA dann mit microRNA-spezifischen und LNA™-verstärkten Vorwärts- und Rückwärtsprimern unter Verwendung des interkalierenden miGreen Farbstoffs zum Nachweis von doppelsträngiger DNA amplifiziert (Schritt 2).



Step 2: qPCR Amplifikation



LNA™-Technologie

Locked Nucleic Acids (LNA™) sind chemisch modifizierte Nukleotide, die im Vergleich zu herkömmlichen DNA- oder RNA-Oligonukleotiden eine wesentlich höhere Affinität zu ihrem Komplementärstrang aufweisen. Dies führt zu einer noch nie dagewesenen Empfindlichkeit und Spezifität und macht LNA™-Oligonukleotide aufgrund ihrer kurzen Länge und ihres unterschiedlichen Gehalts an G-C- und A-T-Basen ideal für den Nachweis von microRNAs. Ohne LNA™ könnten die heterogenen Hybridisierungseigenschaften zu einer unspezifischen und wenig effizienten Primerbindung führen und die Datenqualität beeinträchtigen.

Lagerung und Haltbarkeit der Kitkomponenten

Der hepatomiR® Chemistry-Kit wird auf Trockeneis versandt und **muss bei -20°C gelagert werden**. Die hepatomiR®-qPCR-Platten werden bei Raumtemperatur versandt und **müssen bei -20°C gelagert werden**. Das Plasma RNA Extraktions Kit wird bei Raumtemperatur versandt. Lagern Sie die Spin Columns sofort bei 2-8 °C. Unter diesen Bedingungen sind alle Komponenten bis zum Verfallsdatum, das auf der Verpackung oder des Fläschchen angegeben ist, stabil. Bitte beachten Sie, dass jede Produktkomponente (Plasma RNA Extraktions Kit, hepatomiR® Chemistry-Kit, hepatomiR® qPCR Platten) eine individuelle Haltbarkeitsdauer mit möglicherweise unterschiedlichen Verfallsdaten aufweist.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der hepatomiR®-Kit Arbeitsablauf sollte von qualifiziertem und geschultem Personal durchgeführt werden, um das Risiko fehlerhafter Ergebnisse zu vermeiden. Verwenden Sie separate Bereiche für die Vorbereitung von Patientenproben, RNA, cDNA und qPCR, um Kontaminationen zu vermeiden.

- Dieses Produkt ist nur für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.
- Blutproben sollten immer so behandelt werden, als ob sie infektiös bzw. biologisch gefährlich wären, in Übereinstimmung mit sicheren Laborverfahren.
- Beachten Sie die notwendigen Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Blutproben. Verwenden Sie persönliche Schutzausrüstung (PSA) gemäß den geltenden Richtlinien für den Umgang mit potenziell infektiösen Proben.
- Verwenden Sie immer Pipettenspitzen mit Aerosolbarrieren. Die verwendeten Spitzen müssen steril und frei von DNasen und RNasen sein.
- Essen, trinken, rauchen Sie nicht und wenden Sie keine Kosmetikprodukte in den Arbeitsbereichen an.
- Verwenden Sie das Kit nicht nach Ablauf des Verfallsdatums.
- Verwenden Sie das Kit nicht, wenn die Komponenten nach der Lieferung beschädigt sind.
- Entsorgen Sie den Abfall gemäß den örtlichen Vorschriften.
- Die Reagenzien müssen vor und nach der Verwendung unter den richtigen Bedingungen gelagert werden.
- Versuchen Sie, nur Chargen für die Komponenten 1, 2 und 3 zu verwenden, die zusammen geliefert wurden. Mischen Sie keine Chargen von Komponenten, die nicht zusammen geliefert wurden.
- Die hepatomiR®-Komponenten können unterschiedliche Verfallsdaten haben. Wir empfehlen, die Daten der einzelnen Komponenten (Plasma RNA Extraktions Kit, hepatomiR® Chemistry-Kit, hepatomiR®-qPCR Platten) bei der Ankunft zu überprüfen und zu dokumentieren.
- Waschpuffer 1 und Lysepuffer enthalten Guanidinthiocyanat, das in Verbindung mit Bleichmitteln hochreaktive Verbindungen bilden kann. Falls Flüssigkeit, die diese Lösungen enthält, verschüttet wird, mit einem geeigneten Laborreinigungsmittel und Wasser reinigen. Falls die verschüttete Flüssigkeit potenziell infektiöse Erreger enthält, reinigen Sie den betroffenen Bereich zunächst mit Laborreiniger und Wasser und anschließend mit 1 % (v/v) Natriumhypochlorit.

Sicherheitsdatenblätter (MSDS) sind online im praktischen und kompakten PDF-Format unter <https://www.tamirna.com/hepatomir-kit-ce-ivd/> verfügbar.

- Jeder schwerwiegende Vorfall im Zusammenhang mit dem Produkt muss dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Nutzer bzw. Patient niedergelassen ist, gemeldet werden.

Wahl des Biofluids

Probentyp: Der hepato*mi*R®-Test erfordert die Verwendung von doppelt zentrifugiertem Plasma, um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten. Bitte beachten Sie auf Seite 22 dieses Handbuchs das spezifische Blutentnahmeprotokoll. **Wichtig:** Heparin als Antikoagulans ist mit der RT-qPCR-Analyse nicht kompatibel und muss vermieden werden. CTAD (Citrat, Theophyllin, Adenosin und Dipyridamol) wurde ausschließlich bei der Entwicklung des hepato*mi*R®-Kits verwendet. Citrat hat nachweislich zu vergleichbaren Ergebnissen geführt.

Tabelle 3 beschreibt die Arten von Antikoagulanzen und Röhrchenherstellern zusammen, die getestet wurden und vergleichbare Ergebnisse gezeigt haben:

Tabelle 3
Kompatible Sammelröhrchen

Kompatible Sammelröhrchen			
Hersteller	Katalognummer	Antikoagulans	Volumen mL
Greiner, VACUETTE®	454387	Citrat	3,5 ml
Greiner, VACUETTE®	454064	CTAD	3,5 ml

Präanalytische Standardisierung

Die Bedingungen während der Blutabnahme und Plasmazentrifugation können den Nachweis von microRNAs beeinträchtigen, vor allem aufgrund von Hämolyse, Thrombozytenaktivierung oder Verunreinigung durch Thrombozyten und andere Blutzellen. Um die präanalytische Variabilität zu minimieren und die Datenqualität zu verbessern, müssen alle Protokolle für die Entnahme und Verarbeitung von plättchenarmem Plasma (PPP) standardisiert werden.

Wir empfehlen, die folgenden Punkte in die präanalytischen Studienprotokolle aufzunehmen:

- Patientenvariationen: Falls möglich, standardisieren Sie den Zeitpunkt der Blutentnahme. Zirkadianer Rhythmus, Aktivität und Ernährung beeinflussen bekanntermaßen den Gehalt an zirkulierenden microRNAs bei Patienten.
- Verwenden Sie standardisierte Nadeln und nur Plasmasammelröhrchen, die in Tabelle 3 angegeben sind. Wir empfehlen, für die Blutentnahme 21G (gauge) Nadeln zu verwenden.

- Die Blutentnahme muss von einer geschulten Person durchgeführt werden. Beim Umgang mit Proben sind stets Handschuhe zu tragen. Dies umfasst u. a. das Entfernen des Gummistopfens von den Blutröhrchen, das Zentrifugieren, das Pipettieren, die Entsorgung kontaminierter Röhrchen und die Beseitigung von verschütteten Flüssigkeiten. Röhrchen, Nadeln und Pipetten müssen gemäß den institutionellen Anforderungen ordnungsgemäß in Biobehältern entsorgt werden.
- Universelle Vorsichtsmaßnahmen, OSHA (Occupational Safety and Health Administration) und institutionelle Anforderungen (<http://www.osha.gov/SLTC/biologicalagents/index.html>) sollten befolgt werden, einschließlich Handschuhe, Augenschutz oder Arbeiten in einer biologischen Sicherheitswerkbank für die Blutverarbeitung.
- Die Inkubations- und Zentrifugationsprotokolle für die Gewinnung von Plasma aus Vollblut müssen standardisiert sein und strikt eingehalten werden (genaue Protokolle siehe „Plasmaentnahme“ auf Seite 22).
- Die Hämolyse (sichtbar als rot gefärbte Probe) muss für alle verwendeten Proben aufgezeichnet werden (siehe „Qualitätskontrolle“ auf Seite 17 für weitere Einzelheiten zum Nachweis der Hämolyse in Ihren Proben).
- Plasmaproben können Substanzen enthalten, die die RT-qPCR-Reaktion hemmen. Ein wichtiger Hemmstoff ist Heparin. Daher muss die Verwendung von Lithium-Heparin als Antikoagulans vermieden werden.
- Nach dem Auftauen der gesammelten Plasmaproben bei Raumtemperatur ist darauf zu achten, dass die Proben stets kühl gehalten werden (auf Eis oder 4°C) und häufige Gefrier-Auftauzyklen vermieden werden. Niedrige Temperaturen sind für die Stabilität der RNA und der Probenmatrix unerlässlich.
- Für die Handhabung von Plasma sowie RNA/DNA müssen RNase-freie Filterspitzen und Nuklease-freie Mikrozentrifugenröhrchen mit optimierten Oberflächeneigenschaften zur Verhinderung der Adsorption von Nukleinsäuren („low bind“) verwendet werden.

Lagerung und Haltbarkeit von Plasma, RNA und DNA

Nach der Blutentnahme sollte das plättchenarme Plasma (PPP) innerhalb von 120 Minuten für die Analyse (RNA-Isolierung) verwendet werden. Falls eine sofortige Analyse nicht möglich ist, kann das PPP bis zu einem Jahr bei -80 °C gelagert werden.

Sämtliche Proben sollten in nukleasefreien Kunststoffröhrchen mit minimalen Absorptionsraten für Nukleinsäuren (sogenannte "low bind" Röhrchen) aufbewahrt werden. Um Einfrier- und Auftauzyklen zu vermeiden, wird die Herstellung von Aliquoten von PPP empfohlen. Wir empfehlen ein Aliquotvolumen von 225 µl PPP.

PPP- und RNA-Proben müssen langfristig bei -80°C gelagert werden und während der Arbeitsprozesse stets auf Eis liegen.

Die Gesamt-RNA-Proben sollten in nukleasefreien Röhrchen mit "low-bind" Beschichtung bei -80°C für höchstens 6 Monate vor der Analyse gelagert werden.

Unverdünnte cDNA muss bei -20°C gelagert werden und kann bis zu 5 Wochen nach der ersten Lagerung verwendet werden. Vermeiden Sie mehr als 5 Gefrier-/Auftauzyklen von gefrorener RNA und unverdünnten cDNA-Proben.

Arbeiten mit RNA

RNasen sind sehr stabile und robuste Enzyme, die RNA abbauen. Vor der Arbeit mit RNA wird empfohlen, eine RNase-freie Umgebung zu schaffen und dabei die folgenden Vorsichtsmaßnahmen zu beachten:

- Die RNase-freie Arbeitsumgebung sollte nicht in der Nähe von mikrobiologischen Arbeitsplätzen liegen.
- Saubere Einweghandschuhe sind stets beim Umgang mit Reagenzien, Proben, Pipetten, Einwegröhrchen usw. zu tragen.
- Es wird empfohlen, die Handschuhe häufig zu wechseln, um eine Kontamination zu vermeiden.
- Bestimmte Lösungen, Spitzen, Röhrchen, Laborkittel, Pipetten usw. sollten speziell für RNA-Arbeiten bereitgestellt werden.
- Sämtliche zu verwendenden Lösungen müssen mit molekularbiologisch einwandfreiem, nukleasefreiem Wasser hergestellt werden.
- Reinigen Sie sämtliche Oberflächen mit handelsüblichen RNase-Dekontaminationslösungen.
- Beim Arbeiten mit gereinigten RNA-Proben ist darauf zu achten, dass diese gekühlt (z.B. Nasseis oder Kühlblöcke) bleiben.
- Zentrifugieren Sie sämtliche Reaktions- und Probenröhrchen vor dem Öffnen.
- Verwenden Sie Pipettenspitzen mit Filterbarriere, um eine Kontamination durch Aerosole zu vermeiden.

Es wird empfohlen, ausgewiesene Bereiche für das PCR-Setup und die PCR-Amplifikation einzurichten und aufrechtzuerhalten, da die Gefahr besteht, dass Reagenzien mit amplifizierter DNA kontaminiert werden.

Die Isolierung der RNA und die Reaktionsschritte, die der RT-PCR vorausgehen, sollten in Räumen oder Bereichen durchgeführt werden, die von den Bereichen, in denen PCR-Experimente durchgeführt werden, getrennt sind, um eine Kontamination mit amplifizierter DNA zu vermeiden. Verwenden Sie separate saubere Laborkittel für die Vorbereitung von RNA-Proben, die cDNA-Synthese und die Durchführung von PCR-Reaktionen oder die Handhabung von PCR-Produkten. Vermeiden Sie es, Gefäße mit amplifizierten PCR-Produkten in den PCR-Einrichtungsbereich zu bringen und zu öffnen.

Qualitätskontrolle

Synthetische Spike-in-Kontrollen

Im hepatomiR® kit werden Spike-in-Kontrollen verwendet, um die Effizienz und das korrekte Ergebnis jedes Arbeitsschritts im Experiment zu überwachen. Sie können verwendet werden, um Ausreißer zu identifizieren, die auf das Vorhandensein von Inhibitoren oder eine falsche Handhabung zurückzuführen sind.

Einheitliche Cq-Werte für die Spike-Ins belegen eine erfolgreiche und homogene RNA-Isolierung, reverse Transkription und qPCR-Amplifikation der Proben. Synthetische Spike-ins geben keinen Aufschluss über den RNA-Gehalt und die Qualität der biologischen Probe.

RNA-Spike-in – die synthetische RNA-Spike-in wird der Probe während der RNA-Isolation zugesetzt. Sie wird zur Überwachung der RNA-Isolationseffizienz verwendet. Die Sequenz wurde so konzipiert, dass sie nicht mit eukaryotischen Genomen übereinstimmt und daher für alle Arten verwendet werden kann.

cDNA-Spike-in – die synthetische cDNA-Spike-in wird der extrahierten RNA während der reversen Transkription in cDNA zugesetzt. Sie wird als Kontrolle für die Effizienz der reversen Transkription verwendet. Sie beinhaltet eine microRNA-Sequenz aus dem Fadenwurm *C. elegans*, die in Säugetierarten nicht vorkommt. Bekanntermaßen bringt die Effizienz der reversen Transkription die größte technische Varianz in RT-qPCR-Daten mit sich.

PCR spike-in – diese synthetische DNA wird zusammen mit Primern an einer fixen Position auf jede hepatomiR®-Testplatte beschichtet („coated“). Die PCR-Spike-in wird zur Überwachung der PCR-Effizienz und zum Nachweis von PCR-Hemmstoffen in Proben verwendet.

Die Ergebnisse aller drei Spike-Ins werden mit dem hepatomiR® -Analyse-Toolkit analysiert und zur Qualitätskontrolle verwendet. Nur Proben, bei denen die Spike-in-Werte innerhalb des erwarteten Referenzbereichs liegen, werden für die Berechnung des hepatomiR®-p-Score verwendet.

Hämolyse

Hämolyse kann eine Hauptursache für Schwankungen der Serum-/Plasmaspiegel von microRNA sein, die auf eine Kontamination mit zellulärer RNA zurückzuführen ist.

Das Vorhandensein einer Hämolyse sollte bei jeder Probe visuell geprüft werden. Darüber hinaus kann die Hämolyse mit Hilfe des Hämolyse-Index bewertet werden, der auf der relativen Expression von miR-451a im Vergleich zu miR-23a-3p basiert. Ein Anstieg von miR-451a im Vergleich zu miR-23a-3p deutet auf das Vorhandensein einer Hämolyse in Humanserum- oder Plasmaproben hin. Das hepatomiR®-Analyse-Toolkit berechnet und überprüft automatisch den Hämolyse-Index. Nur Proben mit einem Hämolyse-Index < 7 bestehen die Qualitätskontrolle und werden für die Berechnung des hepatomiR®-p-Score verwendet.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Hämolyse ist die Messung der Absorptionsspitze des freien Hämoglobins, indem das freie Hämoglobin mit einem Spektralphotometer wie dem NanoDrop™ gemessen wird. Humanserum- oder Plasmaproben werden als hämolysiert eingestuft, wenn die Absorption bei 414 nm über 0,2 liegt. Allerdings ist das Vorhandensein geringer Mengen zellulärer Verunreinigungen in Serum- oder Plasmaproben mit visuellen oder spektrophotometrischen Mitteln nicht ohne weiteres nachweisbar.

RNA-Ausbeute

Die Bestimmung der RNA-Ausbeute aus 200 µL PPP ist aufgrund der mangelnden Empfindlichkeit der Methode nicht mit optischer Spektrophotometrie oder NanoDrop™ möglich. Wir verwenden daher eine RNA-Spike-in-Kontrolle, um die Effizienz der RNA-Isolation zu überwachen. Um dies zu gewährleisten legt das Analyseprotokoll die Flüssigkeitsvolumina während des gesamten Arbeitsablaufs genau fest (siehe „Laborprotokoll“ auf Seite 23). Der hepatomiR®-Kit verwendet 200 µL PPP für die RNA-Isolation und 4 µL RNA für die reverse Transkription in cDNA. Dies ist die optimale Probenmenge, um eine Hemmung der reversen Transkriptionsreaktion durch Hemmstoffe zu vermeiden, die gemeinsam mit der RNA isoliert werden.

Kit Komponenten

Tabelle 4 
Kit Komponenten

1 Plasma RNA Extraktions Kit (Komponente 1/3)

Diese Box enthält genügend Reagenzien, um RNA aus 50 PPP-Proben zu isolieren.

1 x	Lysis Buffer	20 ml
1 x	Protein Precipitation Buffer	8 ml
1 x	Wash Buffer 1	15 ml*
1 x	Wash Buffer 2	11 ml**
1 x	RNase-free water	10 ml
1 x	Spin columns	50
1 x	Collection tube 1,5 ml (mit Deckel)	50
1 x	Collection tube 2 ml (ohne Deckel)	50



* Fügen Sie 2 Volumina (30 mL) von 96%-100%igem Ethanol hinzu

** Fügen Sie 4 Volumina (44 mL) von 96%-100%igem Ethanol hinzu

2 hepatomiR®-chemistry (Komponente 2/3)

Diese Box enthält Spike-in-Kontrollen, alle Reagenzien für die cDNA-Synthese, sowie den miGreen Mix. Jedes Reagenz ist mit einem Verfallsdatum gekennzeichnet.

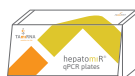
1 x	RNA-Spike-in-Mix (blauer Deckel)	getrocknet
1 x	cDNA-Spike-in-Mix (gelber Deckel)	getrocknet
1 x	5x RT Buffer (brauner Deckel)	0,1 ml
1 x	10x RT Enzyme Mix (roter Deckel)	0,05 ml
4 x	RNase-free water (transparenter Deckel)	1,5 ml
5 x	2x miGreen Mix (grüner Deckel)	1 ml
1 x	Glycogen (5 mg/ml) (transparenter Deckel)	0,125 ml
1 x	ROX Reference Dye	1 ml



3 Primer-beschichtete hepatomiR®-qPCR-Platten (Komponente 3/3)

Das Plattenformat hängt vom qPCR-Instrument ab. Formattyp, LOT und Ablaufdatum sind auf dem Plattenetikett angegeben.

8 x	Primer-beschichtete 96-Well-qPCR-Platten	
2 x	Primer-beschichtete 384-Well-qPCR-Platten	



Verbrauchsmaterialien und Instrumente, die nicht von TAmiRNA bereitgestellt werden

Stellen Sie sicher, dass Sie über alle erforderlichen Verbrauchsmaterialien und Ausrüstungen verfügen, bevor Sie fortfahren.

Tabelle 5
Liste nicht gelieferter Reagenzien

Überprüfen	Reagenz	Zweck	Vorgeschlagener Lieferant
☐	Ethanol absolut zur Analyse	• RNA-Isolierung: Verdünnung der Waschpuffer 1 und 2 (Schritt 1)	Merck-Millipore Kat: 1.00983.1011
☐	Isopropanol zur Analyse	• RNA-Isolierung: Schritt 8.	Merck-Millipore Kat: 1.09634.1011
☐	Nukleasefreies Wasser	• Vorbereitung von 80%igem EtOH zum Waschen (Schritt 10c).	Qiagen Kat: 129115
Überprüfen	Materialien und Ausrüstung	Zweck	Vorgeschlagener Lieferant
☐	Nukleasefreie PCR-Röhrchen (0,1 ml)	• Durchführung der reversen Transkription	Allgemeiner Laborlieferant
☐	Nukleasefreie, "low-bind" Röhrchen (1,5 ml)	• Lagerung der extrahierten RNA.	z.B. Starlab Kat: E1415-2600 z.B. Eppendorf Kat: 0030108418
☐	Nukleasefreie Filterpipettenspitzen	• Sämtliche Pipettierschritte.	Allgemeiner Laborlieferant
☐	Kalibrierte Pipetten für 0,2-2 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	• Sämtliche Pipettierschritte.	Allgemeiner Laborlieferant
☐	Zentrifuge für 1,5-2,0 mL-Mikroröhrchen mit Kühlung (4 °C) und 12.000 Umdrehungen pro Minute.	• Präanalytische Vorbereitung des plättchenarmen Plasmas (PPP). • RNA-Isolierung (Schritte 3, 5, 8-10)	• Eppendorf-Modelle 5418R, 5425R oder 5427R • Hettich Mikro 200 R • iFuge M24PR
☐	Zentrifuge für Multiwell-platten	• Vorbereitung von qPCR-Platten (Schritte 19-20)	Allgemeiner Laborlieferant
☐	PCR- oder Thermocycler mit der Fähigkeit, 10 µl Reaktionen in 0,1 mL PCR-Röhrchen zu inkubieren	• cDNA-Synthese (Schritt 15)	Eppendorf Mastercycler
☐	Vortexmischer	• Alle Probenmischschritte.	Allgemeiner Laborlieferant
☐	Quantitative PCR (qPCR)-Maschine mit SYBR® grünem Kanal	• qPCR (Schritt 20)	Siehe Tabelle 5 unten für alle unterstützten Instrumente.
☐	Dichtfolien für PCR-Platten, transparent, geeignet für qPCR	• qPCR (Schritt 19)	z.B. Starlab, Kat: E2796-9795

Plattenformat und PCR-Cycler

Plattenformat 96-Well	Cycler
A	QuantStudio 5 / 5 Dx (96-well Standard Block)
D	Bio-Rad CFX96™
F	Roche® LightCycler® 480 (96-Well-Block)
Plattenformat 384-well	Cycler
G	Roche® LightCycler® 480 (384-Well-Block)

Plasmagewinnung

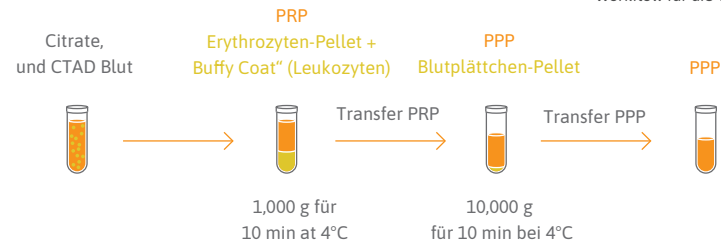
Der hepatomiR® Workflow benötigt 200 µl plättchenarmes Plasma (PPP).

Für die Blutentnahme empfehlen wir die in Tabelle 3 auf Seite 13 aufgeführten, bisher erfolgreich getesteten 21G Nadeln und Entnahmeröhrchen zu verwenden.

Die vollständig gefüllten Blutabnehmeröhrchen sollten sofort nach der Blutentnahme 8-10 Mal invertiert werden. Plasmaröhrchen können vor dem Zentrifugieren **bis zu 2 Stunden lang in aufrechter Position bei Raumtemperatur gelagert werden.**

Abbildung 4

Workflow für die Vorbereitung von PPP



Zentrifugieren Sie die Blutprobe bei 1.000 g für 10 Minuten bei 4°C in einem horizontalen Rotor (Ausschwingkopf). Nach der Zentrifugation muss der Überstand (Plasma) in ein neues RNase-freies Röhrchen mit ausreichendem Volumen überführt werden.

Zentrifugieren Sie die Plasmaprobe bei 10.000 g für 10 Minuten bei 4°C in einem horizontalen Rotor, um plättchenarmes Plasma (PPP) zu erhalten. Verwenden Sie eine saubere Pipette und nukleasefreie Filterspitzen, um das PPP vorsichtig in ein beschriftetes nukleasefreies (1,5ml) Röhrchen zu

übertragen. Es wird ein Aliquotvolumen von 225 µl empfohlen, so dass 200 µl sicher für die RNA-Isolation verwendet werden können. Schließen Sie die Deckel der Röhrchen fest.

Hinweis: Gießen Sie das Plasma niemals ab; wenn Sie das Plasma direkt aus dem Entnahmeröhrchen abgießen, gelangen überschüssige Zellen in die Probe. Zur Entnahme des Plasmas beginnen Sie am oberen Ende des Röhrchens und ziehen die Probe vorsichtig in die Pipette, während Sie mit der Pipettenspitze weiter nach unten gehen. Eine Restschicht von ca. 0,5 ml Plasma stellt sicher, dass die Buffy-Coat- und Zellschicht nicht gestört wird.

Überprüfen Sie, ob die Deckel aller Aliquote fest sitzen und ob alle Röhrchen beschriftet sind. Legen Sie alle Aliquote aufrecht in eine Probenbox oder ein Gestell in einem Gefrierschrank bei -80°C oder kälter. Sämtliche Proben sollten vor der Analyse oder dem Versand bei -80°C oder kälter gelagert werden. Die Probenaliquote sollten vor der Analyse oder dem Versand nicht aufgetaut werden.

Laborprotokoll

Die RNA-Isolation wurde **auf ein Volumen von 200 µl PPP** als Ausgangsmaterial standardisiert, um eine hohe RNA-Ausbeute zu gewährleisten und eine Hemmung der RT-qPCR Analyse zu verhindern.

RNA-Isolation

Wichtige Punkte vor Beginn

- **Lysepuffer und Waschpuffer 1 können bei Lagerung einen Niederschlag bilden. Falls erforderlich, lösen Sie sie durch Erwärmen wieder auf und stellen sie dann bei Raumtemperatur auf.**
- **Bringen sie die Puffer vor Beginn des Protokolls auf Raumtemperatur.**
- **Bereiten Sie 80 %iges Ethanol für Schritt 10c vor.**
- **Sämtliche Schritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Arbeiten Sie zügig.**

Wichtiger Hinweis:

Falls Sie die hepatomiR[®]-Analyse zum ersten Mal durchführen, empfehlen wir dringend, mit einer Pilotanalyse zu beginnen. Verwenden Sie für diese Pilotanalyse nur eine kleine Teilmenge Ihrer Proben und analysieren Sie Ihre Daten mit der hepatomiR Software Applikation, siehe Seite 29. Sobald Sie sich vergewissert haben, dass die Proben- und Datenqualität in Ordnung ist, fahren Sie mit der vollständigen Analyse fort.



ACHTUNG: Geben Sie Bleichmittel oder saure Lösungen NICHT direkt in Abfälle, die Lysepuffer und Waschpuffer 1 enthalten.

Dieses Protokoll ist für die Analyse von humanem Plasma konzipiert.

Nur bei erstmaliger Verwendung

Schritt 1 Herstellung von Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2	Fügen Sie dem Waschpuffer 1 30 ml >99 %iges Ethanol hinzu. Fügen Sie dem Waschpuffer 2 44 ml >99 %iges Ethanol hinzu. Hinweis: Das Etikett auf der Flasche enthält ein Kästchen, das angekreuzt werden muss, um anzuzeigen, dass das Ethanol hinzugefügt wurde.
Schritt 2 Resuspension von lyophilisierten Spike-in-Kontrollen (RNA-Spike-in und cDNA-Spike-in)	• Zentrifugieren Sie die Röhrchen vor der Verwendung bei 3.000 g für 2 Minuten bei Raumtemperatur. • Resuspendieren Sie die Spike-Ins (im Lieferumfang des hepatomiR® Chemistry Kits enthalten) durch Zugabe von 80 µl nukleasefreiem Wasser. • Mischen sie die Spike-in Kontrollen durch Vortexen und kurzes zentrifugieren. Inkubieren Sie die Spike-Ins 20 Minuten lang auf Eis um vollständige Resuspension zu gewährleisten. • Mischen Sie durch erneutes vortexen/zentrifugieren und aliquotieren Sie die Spike-ins in RNAse-freie "low-bind" Röhrchen (nicht zur Verfügung gestellt, empfohlen werden Aliquote von 20µl). • Lagern sie die resuspendierten Spike-in Aliquote bei -20 °C.
Schritt 3 Herstellung von 80 %igem EtOH vor	Mischen Sie 10 ml nukleasefreies Wasser mit 40 ml Ethanol (siehe Tabelle 5), um 50 ml 80%iges Ethanol zu erhalten (erforderlich für Schritt 10c).
RNA-Isolierung	
Schritt 4 Tauen Sie PPP Proben und Glykogen auf	Nach dem Auftauen auf Raumtemperatur werden die PPP-Proben bei 12.000 g für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, um etwaige Rückstände und unlösliche Komponenten zu pelletieren und die Wirkung von Hemmstoffen/Nukleasen zu verringern. Übertragen Sie genau 200 µl PPP in ein neues 1,5-ml-Röhrchen (nicht zur Verfügung gestellt). Tauen Sie das Glykogen bei Raumtemperatur auf und lagern Sie es auf Eis.
Schritt 5 PPP-Lyse	Bereiten Sie den Lyse-Mix vor: Fügen Sie pro Probe 1 µl RNA-Spike-in zu 60 µl Lysepuffer hinzu. Für mehrere Proben bereiten Sie einen Mastermix mit 2 zusätzlichen Reaktionen vor. Fügen Sie den 200 µl PPP 61 µl Lyse-Mix zu. Vortexen Sie 5 Sek. lang und inkubieren Sie für 3 Min. bei Raumtemperatur. Wichtiger Hinweis: Der RNA-Spike-in muss mit dem Lysepuffer gemischt werden, bevor er mit der PPP-Probe gemischt wird - wird er direkt zur Probe hinzugefügt, wird er schnell abgebaut.

		Notizen
Schritt 6 Proteinfällung	Fügen Sie der lysierten Probe 20 µl des Protein Precipitation Buffers hinzu. Vortexen Sie >10 Sek. und inkubieren Sie 3 Min. bei Raumtemperatur. Bei der Verarbeitung mehrerer Proben, vortexen Sie sofort nach Zugabe des Protein precipitation buffers. Die Lösung sollte sich in eine milchige Suspension verwandeln. Zentrifugieren Sie 3 Minuten bei 12.000 g bei Raumtemperatur.	
Schritt 7 Übertragung des Überstands	Übertragen Sie genau 200 µl des klaren Überstandes (wässrige Phase) in ein neues Sammelröhrchen (1,5 ml, mit Deckel zur Verfügung gestellt) und fügen Sie 2 µl Glykogen (5 mg/ml) hinzu. Vortexen und kurz zentrifugieren.	
Schritt 8 Passen Sie Bindungsbedingungen an	Fügen Sie 200 µl Isopropanol hinzu. 5 Sekunden am Vortex mischen und danach kurz zentrifugieren.	
Schritt 9 Beladen der Spin-Säule	Nehmen Sie eine Spin Column mit Sammelröhrchen und laden Sie die gesamte Probe auf die Säule. Zentrifugieren Sie 30 Sek. bei 8.000 g bei Raumtemperatur. Verwerfen Sie den Durchfluss und setzen Sie die Spin Column zurück in das Sammelröhrchen.	
Schritt 10a Waschen und trocknen	Pipettieren Sie 700 µl Wash Buffer 1 auf die Spin Column. Zentrifugieren Sie 30 Sek. bei 8.000 g bei Raumtemperatur. Verwerfen Sie den Durchfluss und setzen Sie die Spin Column zurück in das Sammelröhrchen.	
Schritt 10b Waschen und trocknen	Pipettieren Sie 500 µl Wash Buffer 2 auf die Spin Column. Zentrifugieren Sie 30 Sek. bei 8.000 g bei Raumtemperatur. Verwerfen Sie den Durchfluss und setzen Sie die Spin Column zurück in das Sammelröhrchen.	
Schritt 10c Waschen und trocknen	Pipettieren Sie 500 µl 80%iges Ethanol auf die Spin Column. Zentrifugieren Sie für 2 Min. bei 8.000 g bei Raumtemperatur. Transferieren Sie die Spin Column in ein neues 2mL Sammelröhrchen (ohne Deckel). Zentrifugieren Sie 5 Minuten bei 12.000 g bei Raumtemperatur. Nach der Zentrifugation, lassen Sie die Spin Column für 1 Minute offen, um die Membran vollständig zu trocknen.	
Schritt 11 Elution	Setzen Sie die Spin Column in ein "low-bind" Sammelröhrchen (1,5 ml nicht zur Verfügung gestellt). Laden Sie 30 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran der Spin Column. Inkubieren Sie 1 Min. bei Raumtemperatur. Schließen Sie den Deckel und zentrifugieren Sie 1 Min. bei 12.000 g bei Raumtemperatur.	
Schritt 12 Lagerung	Lagern Sie die frisch eluierte RNA-Probe sofort bei -80°C oder fahren Sie mit der cDNA-Synthese fort (Schritt 13).	

cDNA-Synthese

Bewahren Sie Proben, Reagenzien und Reaktionen stets auf Eis (oder bei 4 °C) auf.

Notizen

Schritt 13

**Tauen Sie die
Gesamt-RNA auf**

Tauen Sie die RNA (aus Schritt 12) und den cDNA-Spike-in auf Eis auf.

Schritt 14

**Bereiten Sie die
Reagenzien vor**

Tauen Sie den 5x RT Buffer und nukleasefreies Wasser auf und stellen Sie es auf Eis. Unmittelbar vor der Verwendung nehmen Sie den 10x RT Enzyme Mix aus dem Gefrierschrank, mischen Sie durch Schwenken des Röhrchens und stellen sie auf Eis. Zentrifugieren sie alle Reagenzien kurz bevor Sie sie verwenden.

Schritt 15

**Bereiten Sie die cDNA-
Synthesemischung vor**

Falls Sie die cDNA-Synthese mit mehreren RNA-Proben gleichzeitig durchführen, bereiten Sie einen Mastermix mit 1 zusätzlichen Reaktion vor.

Reagenz (Volumina in µL)	10 µl Rxn
5x RT Buffer	2
cDNA-Spike-In	1
Nukleasefreies Wasser	2
10x RT Enzyme Mix	1
Gesamtvolumen	6

Pipettieren Sie 4 µl RNA in jedes Röhrchen und fügen Sie 6 µl cDNA-Mastermix hinzu. Mischen Sie durch Pipettieren und zentrifugieren Sie danach kurz ab.

Schritt 16

**Inkubieren und Hitze
Inaktivierung**

Inkubieren Sie die Reaktion 60 Minuten bei 42°C. Hitzeinaktivieren Sie die Reverse Transkription bei 95°C für 5 Minuten. Kühlen Sie sofort auf 12°C ab.

Schritt 17

Lagerung

Überführen Sie die unverdünnte cDNA in nukleasefreie "low-bind" Röhrchen und lagern Sie sie bei -20°C bis zu 5 Wochen ein.

Wichtiger Hinweis:

Für die Vorbereitung des qPCR-Mastermix wählen Sie die Anweisungen entsprechend Ihrem Gerät: Ohne ROX (z. B. Roche LightCycler/Bio-Rad CFX): Siehe Schritt 18a–21a.
Mit ROX (z. B. ThermoFisher QuantStudio): Siehe Schritt 18b–21b.

qPCR-Mastermix-Setup ohne ROX
(z. B. Roche LightCycler/Bio-Rad CFX)

Notizen

Schritt 18a
Tauen Sie die
Reagenzien auf

Tauen Sie die cDNA (aus Schritt 17) und den miGreen-Mastermix 15-20 Minuten auf Eis auf. Bewahren Sie die Reagenzien stets auf Eis auf. Mischen Sie den Mastermix vor der Verwendung durch Auf- und Abpipettieren. 6 Proben können auf einer 96-Well Platte in Duplikaten gemessen werden. 24 Proben können auf einer 384-Well Platte in Duplikaten gemessen werden.

Schritt 19a
Mischen Sie die cDNA
mit Wasser und der
qPCR-Mastermischung

Mischen Sie 3,6 µl cDNA mit 86,4 µl nukleasefreiem Wasser, fügen Sie dann 90 µl miGreen Master Mix hinzu (insgesamt 180 µl). Mischen Sie durch Auf- und Abpipettieren, zentrifugieren Sie kurz, um die Flüssigkeit am Boden zu sammeln. Wiederholen Sie diesen Schritt für sämtliche Proben.
Achtung: miGreen Mastermix ist lichtempfindlich und sollte nicht über längere Zeit dem Licht ausgesetzt werden.

Schritt 20a
Bereiten Sie
die hepatomiR®-
Platte vor

Pipettieren Sie 10 µl Reaktionsmischung (aus Schritt 19a) (cDNA, NFW, Mastermix) gemäß den Abbildungen 5 und 6 in jede der 16 Wells. Verschließen Sie die Platte mit einer geeigneten optischen Folie. Zentrifugieren Sie die Platte bei 1.000 g für 90 Sek. und inkubieren Sie die Platte bei 4°C für mindestens 1 Stunde.

Hinweis: Die Platte kann bis zu 24 Stunden bei 4°C und lichtgeschützt gelagert werden.

Schritt 21a
Führen Sie die qPCR
durch

Vor der Durchführung der qPCR, zentrifugieren Sie die Platte bei 1.000 g für 90 Sek. Führen Sie eine qPCR- und Schmelzkurvenanalyse anhand der folgenden Beschreibung durch:

Schritt	Einstellung
Polymerase-Aktivierung/ Denaturierung	95°C , 2 min, Rampe 4,4°C/sec
Amplifikation – 45 Zyklen	Analysemodus: Quantifizierung 95°C, 10 Sek., Rampe 4,4°C/Sek. 56°C, 60 Sek., Rampe 2,2°C/sec Aufnahmemodus: einzeln
Schmelzkurve	Analysemodus: Schmelzkurve 95°C, 10 Sek., Rampe 4,4°C/Sek. 55°C, 60 Sek., Rampe 2,2°C/Sek. 99°C, Erfassungsmodus: Kontinuierlich, Rampe 0,11°C/Sek., Erfassung pro°C: 5

qPCR-Mastermix-Setup ohne ROX
(z. B. Roche LightCycler/Bio-Rad CFX)

Schritt 18b
Tauen Sie die
Reagenzien auf

Tauen Sie die cDNA (aus Schritt 17) und den miGreen-Mastermix 15-20 Minuten auf Eis auf. Bewahren Sie die Reagenzien stets auf Eis auf. Mischen Sie den Mastermix vor der Verwendung durch Auf- und Abpipettieren. 6 Proben können auf einer 96-WellPlate in Duplikaten gemessen werden. 24 Proben können auf einer 384-Well-Plate in Duplikaten gemessen werden.

Schritt 19b
Mischen Sie die cDNA
mit Wasser und der
qPCR-Mastermischung

Fügen Sie 10 µL ROX-Farbstoff zu 1 mL miGreen qPCR-Mix hinzu. Beschriften Sie das Röhrchen, um zu vermerken, dass ROX hinzugefügt wurde. Die Mischung kann bei -20°C für wiederholte Verwendung aufbewahrt werden.
Mischen Sie 3,6 µL cDNA mit 86,4 µL nukleasefreiem Wasser und geben Sie anschließend 90 µL miGreen-Mastermix hinzu (insgesamt 180 µL). Mischen Sie die Lösung durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren und zentrifugieren Sie kurz, um die Flüssigkeit am Boden zu sammeln. Wiederholen Sie diesen Schritt für sämtliche Proben.
Achtung: Der miGreen-Mastermix ist lichtempfindlich und sollte nicht über längere Zeit dem Licht ausgesetzt werden.

Schritt 20b
Bereiten Sie
die hepatomiR®-
Platte vor

Pipettieren Sie 10 µL Reaktionsmischung (aus Schritt 19b) (cDNA, nukleasefreies Wasser, Mastermix einschließlich ROX) gemäß Abbildung 5 und 6 in jede der 16 Wells hinzu. Verschließen Sie die Platte mit einer geeigneten optischen Folie. Zentrifugieren Sie die Platte bei 1.000 g für 90 Sek. und inkubieren Sie die Platte 4 °C für mindestens 1 Stunde.
Hinweis: Die Platte kann bis zu 24 Stunden bei 4 °C lichtgeschützt gelagert werden.

Schritt 21b
Führen Sie die qPCR
durch

Vor der Durchführung der qPCR, zentrifugieren Sie die Platte bei 1.000 g für 90 Sek. Führen Sie eine qPCR- und Schmelzkurvenanalyse anhand der folgenden Beschreibung durch:

Schritt	Einstellung
Polymerase Aktivierung/ Denaturierung	95°C , 2 min, Rampe 3,66°C/sec
Amplifikation – 45 Zyklen	PCR Stage 95°C, 10 Sek., Rampe 3,66°C/Sek. 56°C, 60 Sek., Rampe 2,2°C/sec Aufnahmemodus: einzeln
Schmelzkurve	Analysemodus: Schmelzkurve 95°C, 10 Sek., Rampe 3,66°C/Sek. 55°C, 60 Sek., Rampe 2,2°C/Sek. 99°C, Erfassungsmodus: Kontinuierlich, Rampe 0,11°C/Sek., Erfassung pro°C: 5

qPCR-Amplifikation

Die hepato*miR*[®]-Testplatte enthält 8 verschiedene microRNA- oder QC-Primerpaare.

qPCR Amplifikation

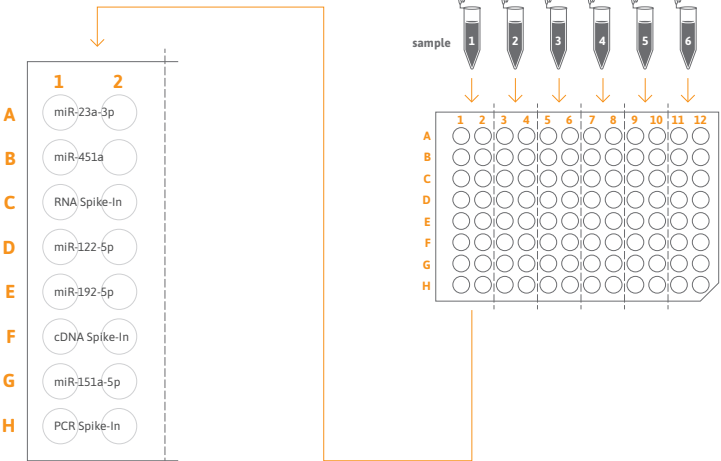


Abbildung 5

96-Well Plattenlayout
und Pipettierschema

qPCR Amplifikation

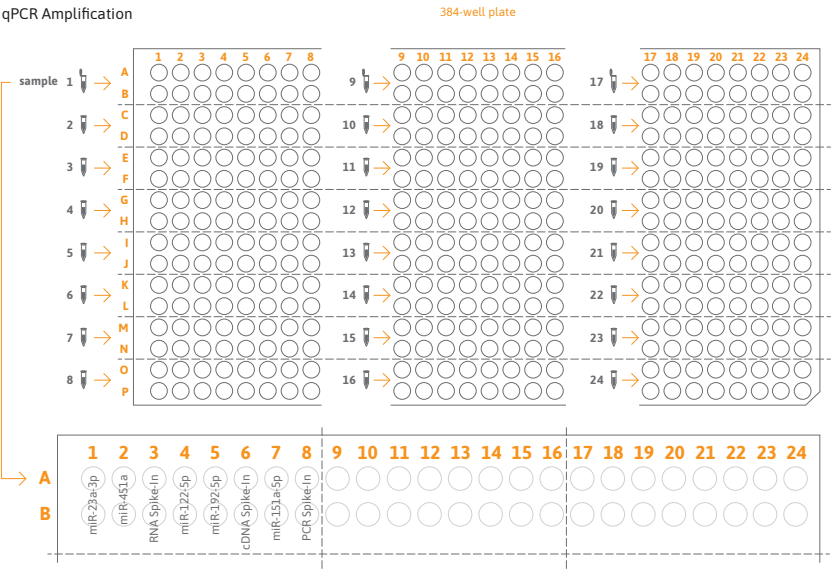


Abbildung 6

Layout der 384-Well Platten
und Pipettierschema

Datenexport und -analyse

Export von qPCR-Rohdaten für die hepatomiR®-Software

Die hepatomiR®-Software benötigt Rohfluoreszenzdaten aus qPCR-Experimenten zur Analyse. Eine manuelle Berechnung der Ct- oder Cq-Werte am Gerät ist nicht erforderlich.

Um eine korrekte Datenanalyse sicherzustellen, exportieren Sie Ihre qPCR-Rohdaten im richtigen Dateiformat, abhängig vom verwendeten Gerät:

Roche Light Cycler: Exportieren Sie die Daten als Textdatei (.txt).

Bio-Rad CFX: Exportieren Sie die Daten als kommagetrennte Datei (.csv).

Thermo Fisher QuantStudio: Exportieren Sie die Daten als Excel-Datei (.xls oder .xlsx).

Sobald die Rohdaten im entsprechenden Format exportiert wurden, können Sie mit der Datenanalyse wie im nächsten Abschnitt beschrieben fortfahren.

Zugriff auf die Software und Datenanalyse

Die aktuellste Softwareversion kann unter der URL: <https://hepatomir.tamirna.com> mit einem Browser (z.B. Google Chrome) auf einem Computer mit Internetanschluss aufgerufen werden. Nach der Anmeldung mit dem angegebenen Benutzernamen und Passwort wird der Nutzer in mehreren Schritten durch den Prozess der Datenanalyse geführt.

Die **Hauptregisterkarte** ("Main") enthält allgemeine Informationen und Download-Links für die neueste Version der Gebrauchsanweisung für das Kit und die Software.

Um die Daten zu analysieren, muss der Nutzer zur Registerkarte **"Analyse"** navigieren. Das verwendete Plattenlayout (96-Well oder 384-Well) wird vom Nutzer über ein Kontrollkästchen ausgewählt. Fluoreszenz-Rohdaten können von allen unterstützten qPCR-Geräten hochgeladen werden (siehe Liste auf Seite 22 dieses Handbuchs). Nach der Bestätigung aller Eingabeparameter (qPCR-Gerät, Plattenlayout und hochgeladener Dateiname) berechnet die Software automatisch Cq-Werte (second derivative maximum Methode). Auf Grundlage der Cq-Werte der Spike-in-Kontrollen (siehe Informationen auf Seite 17), der Hämolysekontrollen und der endogenen microRNAs hsa-miR-122-5p, hsa-miR-192-5p und hsa-miR-151a-5p wird eine Qualitätskontrolle (QC) durchgeführt. Sämtliche Proben, die die Qualitätskontrolle bestanden haben, werden zur Berechnung des hepatomiR®-p-Score aus den PCR-Duplikaten verwendet. Nach einer abschließenden Überprüfung der PCR-Duplikate wird ein Bericht erstellt, der Informationen über den QC-Status ("valid" oder "invalid") für alle Proben sowie den p-Score für alle Proben enthält, die die QC bestanden haben. Für Proben, die die Qualitätskontrolle nicht bestanden haben, wird die entsprechende Ursache im Bericht angezeigt. Der Bericht bietet auch Interpretationshilfen für den Fall, dass bestimmte

Qualitätskontrollen fehlgeschlagen sind. Der Troubleshooting Abschnitt (Seite 31-32) in diesem Handbuch kann bei experimentellen Problemen verwendet werden.

Wichtig: Die Softwareanwendung verarbeitet keine Informationen über Proben-IDs, die möglicherweise in der PCR-Software vergeben wurden. Daher muss der Nutzer die Informationen über die Proben-IDs und die Probenposition aufzeichnen.

Während der Analyse können in der hepatomiR-Software Probenamen eingegeben werden, die im erzeugten Bericht verwendet werden sollen.

Die Registerkarte **Instruction for use** enthält detaillierte Informationen über die Verwendung der aktuellen Softwareversion und die Interpretation von Fehlermeldungen sowie eine Schritt-für-Schritt-Anleitung zur Datenanalyse.

Informationen über die Softwareversion, den Softwareentwickler, eine Supportadresse, das Firmenimpression und einen Haftungsausschluss finden Sie unter der Registerkarte **About**.

Troubleshooting

RNA-Isolierung

Notizen

Schlechte RNA-Recovery

Säule ist verstopft

In den meisten Fällen kann dies passieren, wenn die empfohlenen Mengen an Probenmaterial überschritten wurden. Bei Plasmaproben ist dies unwahrscheinlich. Siehe auch „Verstopfte Säule“ unten

Es wurde eine alternative Elutionslösung verwendet

Für eine maximale RNA-Gewinnung wird empfohlen, die RNA mit dem im Kit enthaltenen RNase-freien Wasser zu eluieren.

RNA-Gehalt

Der RNA-Gehalt im Plasma ist gering, daher ist die Konzentrationsmessung der gereinigten RNA (z. B. spektrophotometrisch oder mit Fluoreszenzfarbstoffen) nicht genau möglich. Das Protokoll wurde unter Verwendung fester Volumina optimiert.

Verstopfte Säule

Temperatur zu niedrig

Achten Sie darauf, dass die Zentrifuge und die Lösungen während des gesamten Verfahrens bei Raumtemperatur (18 - 25 °C) bleiben. Bei Temperaturen unter 15 °C können sich Salzausfällungen bilden, die die Säulen verstopfen können. Falls Salzausfällungen vorhanden sind, erwärmen Sie die Lösung auf 30 °C, bis sie sich vollständig aufgelöst hat, und lassen Sie die Lösungen vor der Verwendung auf Raumtemperatur abkühlen.

degradierte RNA

RNase-Kontamination

RNasen können bei der Arbeit mit den Proben eingeführt werden. Stellen Sie sicher, dass bei der Arbeit mit RNA die richtigen Verfahren eingehalten werden. Bitte lesen Sie den Abschnitt „Arbeiten mit RNA“ am Anfang dieses Handbuchs

Verfahren nicht schnell genug durchgeführt

Um die Integrität der RNA zu erhalten, ist es wichtig, die Arbeitsschritte schnell durchgeführt wird.

		Notizen
Unsachgemäße Lagerung der gereinigten RNA	Für die kurzfristige Lagerung können RNA-Proben bei -20 °C für einige Tage aufbewahrt werden. Bei längerer Lagerung wird empfohlen, die Proben bei -70 °C zu lagern. Vermeiden Sie wiederholte Einfrier-/Auftauzyklen, indem Sie Aliquote Ihrer RNA einfrieren.	
Schlechte RNA Qualität	Spuren von Salz und Ethanol aus dem Bindungsschritt können nachgeschaltete Anwendungen beeinträchtigen. Daher ist Schritt 6 des Protokolls (Waschen) wichtig für die Qualität Ihrer RNA-Probe. Um Salzküsten zu vermeiden, stellen Sie bitte sicher, dass die an die Säule gebundene RNA dreimal mit der mitgelieferten Waschlösung gewaschen wird und stellen Sie sicher, dass die Zentrifugation durchgeführt wird, um Spuren von Ethanol vor der Elution zu entfernen.	
Inhibitoren	Einige einzelne Plasmaproben können Inhibitoren enthalten. Mit Spike-Ins, die jeden Schritt des Protokolls kontrollieren, können Inhibitoren leicht nachgewiesen werden. Proben, die Inhibitoren enthalten, müssen von der Analyse ausgeschlossen werden.	

cDNA- und qPCR-Amplifikation

Problem	Vorschlag	Notizen
Kein fluoreszierendes Signal wird während des PCR festgestellt	Bestätigen Sie die korrekte PCR-Einstellung, indem Sie das für die PCR-Spike-in-Kontrolle erhaltene Signal überprüfen.	
Während der PCR wird kein Fluoreszenzsignal festgestellt, aber der PCR-Spike-in liefert ein gültiges Signal.	Überprüfen Sie, ob der Filter im qPCR-Cycler auf SYBR Green eingestellt war. Überprüfen Sie, ob die optische Anzeige im richtigen Schritt der qPCR-Zyklen erfolgt.	

Weitere Dienstleistungen

TAmiRNA bietet ein breites Spektrum an hochwertigen RNA-Dienstleistungen, die von Experten nach GLP-Standards durchgeführt werden, einschließlich RNA-Isolierung, Sequenzierung und qPCR-Analyse. Lesen Sie mehr über diese Dienstleistungen unter

www.tamirna.com/small-rna-sequencing-services/

Verwandte Produkte

TAmiRNA bietet auch Kits für neuartige microRNA-Biomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen und Knochenqualität an, die in der Forschung eingesetzt werden. Lesen Sie mehr über diese Produkte unter www.tamirna.com.

Weitere Informationen zu Qualitätskontrollen für zell-freie microRNA-Experimente

1. TAmiRNA TechNote TN-05. Quality controls and best practices for analyzing microRNAs in cell-free biofluids by RT-qPCR. April 2019
2. Mussbacher M, Krammer TL, Heber S, Schrottmaier WC, Zeibig S, Holthoff HP, et al. Impact of Anticoagulation and Sample Processing on the Quantification of Human Blood-Derived microRNA Signatures. *Cells*. 2020 Aug 18;9(8):1915.
3. Blondal T, Jensby Nielsen S, Baker A, Andreassen D, Mouritzen P, Wrang Teilmum M, et al. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods* 2013;59:S1–6.
4. Shah JS, Soon PS, Marsh DJ. Comparison of methodologies to detect low levels of hemolysis in serum for accurate assessment of serum microRNAs. *PLoS One* 2016;11:1–12.
5. Mestdagh P, Hartmann N, Baeriswyl L, Andreassen D, Bernard N, Chen C, et al. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nat Methods* 2014;11.

Mitteilung an den Käufer

hepatomiR® ist eine Marke der TAmiRNA GmbH, Wien, Österreich.
LNA™ ist eine eingetragene Marke der QIAGEN GmbH, QIAGEN
Strasse 1, 40724 Hilden. Alle anderen Marken sind Eigentum der
jeweiligen Besitzer.

Patente für die in-vitro-diagnostische Anwendung von microRNAs
zur Vorhersage von Leberfunktionsstörungen wurden in der EU
(EP3814533B1) und den USA (US 17278624), Japan (JP7045527), Süd-
korea (KR102339206) und Kanada (CA3110668C) erteilt und sind in
China ausstehend.

Locked-Nucleic Acids (LNAs™) sind durch US-Patent Nr. 6,639,059,
US-Patent Nr. 6,734,291 und andere Anmeldungen und Patente ge-
schützt, die im Besitz der QIAGEN GmbH, Qiagen Straße 1, 40724
Hilden, sind oder von ihr lizenziert wurden.

Erläuterung der verwendeten Symbole

	In-vitro-Diagnostik
	Katalognummer
	Chargennummer
	Hersteller
	Nicht wiederverwenden
	Verfallsdatum
	Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist
	Lesen Sie die Gebrauchsan- weisung
	Bei 2 °C-30 °C lagern
	Bei -31 °C- -15 °C lagern

Impressum

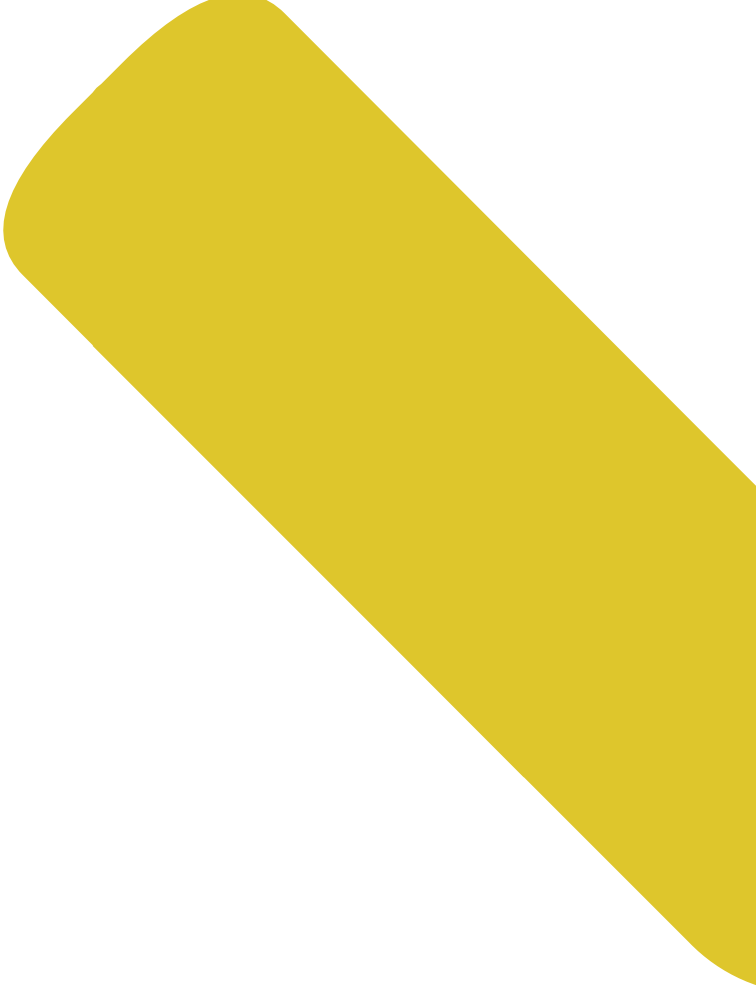
Urheberrecht: 2016 / TAmiRNA GmbH

Text: TAmiRNA GmbH

Konzept & Design: www.fuergestaltung.at

Abbildungen: www.birgitbenda.at

Fotografie: Carina Brunthaler



TAmiRNA GmbH

Leberstraße 20

1110 Wien, Österreich

+43 1 391 33 22 90

www.tamirna.com