

MAST ISOPLEX® DNA Lyo

DNA/LYO1/NCE 100 tests

Utilisation

Kit d'amplification isotherme optimisé conçu pour simplifier la préparation des réactions LAMP (Loop-mediated isothermal amplification). Les séquences d'ADN cibles présentes dans l'échantillon peuvent être amplifiées par ajout d'un ensemble d'amorces de fabrication interne défini

NE PAS UTILISER À DES FINS DE DIAGNOSTIC CLINIQUE. À USAGE EXPERIMENTAL UNIQUEMENT.

Composition

- 10 tubes contenant un culot lyophilisé de MAST ISOPLEX® DNA Lyo (PEL). Chaque culot lyophilisé est suffisant pour effectuer 10 tests. Bouchon rouge.
- Un tube de Positive Control Primers (PCP) lyophilisé. Bouchon bleu.
- Un tube de Positive Control DNA (PCDNA) lyophilisé. (10pg/µl une fois reconstitué). Tube à bouchon vert.
- Un tube avec 1,5mL de Reconstitution Buffer Tris 0,5M (RB). Bouchon jaune.
- Un tube avec 1,5mL de molecular grade water (WTR). Bouchon noir.

Conservation

- Avant ouverture, conserver le kit entre 2°C et 30°C à l'abri de la lumière directe du soleil jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Une fois reconstitués, les culots de MAST ISOPLEX® DNA Lyo, le Positive Control Primers, et le Positive Control DNA doivent être aliquotés et se conservent à -20°C. Conserver tous les autres composants entre 2°C et 30°C à l'abri de la lumière directe du soleil.
- Les culots de MAST ISOPLEX® DNA Lyo reconstitués doivent être utilisés dans les 8 semaines après la première reconstitution du culot.
- Si le culot de MAST ISOPLEX® DNA Lyo n'est pas utilisé pour des tests le jour de la reconstitution, ils peuvent être conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Conserver sous forme de petits aliquots pour éviter les congélations et décongélations répétées. L'activité des culots est stable à cette température durant au moins 8 semaines.
- Ne pas congeler et décongeler les culots reconstitués de MAST ISOPLEX® DNA Lyo plus de 5 fois.
- Conserver les réactifs extraits des kits entre 2°C et 30°C durant la procédure d'expérimentation.
- Replacer tous les réactifs à leur température de stockage appropriée immédiatement après utilisation.
- Le Positive Control DNA (PCDNA) peut être stocké à 2-8°C au besoin le jour de la remise en suspension. Pour une conservation sur le long terme après la reconstitution, stocker sous forme de petits aliquots à -20°C pour éviter les congélations décongélations répétées.

Précautions d'emploi

Prendre les précautions nécessaires pour prévenir la contamination des réactifs du kit MAST ISOPLEX® DNA Lyo et des échantillons. Le kit est conçu pour une utilisation par du personnel qualifié avec l'ensemble d'amorces de fabrication interne défini.

Les tubes utilisés pour la réaction doivent être maintenus fermés pendant toutes les étapes après ajout des réactifs. Les tubes usagés doivent être éliminés sans être ouverts après usage, selon les réglementations de santé et de sécurité locales en vigueur. Ne jamais ouvrir les tubes après amplification pour éviter toute contamination par le produit amplifié.

Ne pas mélanger au vortex les tubes de réaction. S'assurer que tous les tubes ne sont pas éraflés ou fissurés avant utilisation.

Matériels nécessaires non fournis

- Echantillon d'ADN et ensemble d'amorces apportés par l'utilisateur.
- Echantillon d'ADN à tester obtenu selon les procédures de laboratoire standards.
- Dispositifs standards sans DNase : tubes de réaction, pipettes et embouts.
- Instrument pouvant effectuer une incubation isotherme des tubes de la réaction à une température donnée tel que le système Applied Biosystems (ABI) 7500 FAST REAL-TIME PCR, le système ESeQuant TS, ou un thermocycleur interne équivalent. L'instrument doit être équipé d'un lecteur de fluorescence avec un canal de détection du FAM pour la reconnaissance des produits amplifiés.

Procédure

Reconstitution des réactifs

- Reconstituer le culot MAST ISOPLEX® DNA Lyo (PEL) comme suit :
 - Ajouter 20µL de Reconstitution Buffer (RB).
 - Ajouter 68µL de molecular grade water (WTR) à ce mélange (Cela amène le tampon de reconstitution à une concentration finale de 0,1M pour l'analyse).
 - Mélanger doucement les composants en pipétant plusieurs fois les réactifs de bas en haut.
- Reconstituer le Positive Control DNA (PCDNA) comme suit :
 - Faire tourner le tube brièvement dans une microcentrifugeuse pour s'assurer la présence de l'ADN dans le fond du tube.
 - Ajouter 50µL de molecular grade water (WTR) et laisser se dissoudre pendant 5 minutes.
 - Mélanger doucement les composants en pipétant plusieurs fois les réactifs de bas en haut.
- Reconstituer le Positive Control Primers (PCP) comme suit :
 - Faire tourner le tube brièvement dans une microcentrifugeuse pour s'assurer la présence des amorces dans le fond du tube.
 - Ajouter 20µL de molecular grade water (WTR) et laisser se dissoudre pendant 5 minutes.

- c. Mélanger doucement les composants en pipetant plusieurs fois les réactifs de bas en haut.

Réalisation des analyses

Chaque culot de MAST ISOPLEX® DNA *Lyo* reconstitué peut être utilisé pour effectuer 10 tests (10µL par réaction). Pour chaque test :

1. Dans un tube réactionnel stérile sans DNase/RNase, déposer 8.8µL de MAST ISOPLEX® DNA *Lyo* reconstitué, 0.2µL du mélange d'amorces maisons, et 1µL de l'échantillon d'ADN.
2. Pipeter doucement pour mélanger (ne pas mélanger au vortex).
3. Pour un contrôle négatif, préparer un contrôle No-Template Control (NTC) en remplaçant 1µL d'échantillon d'ADN par 1µL de molecular grade water (WTR) par contrôle.
4. Pour un contrôle positif, remplacer l'échantillon d'ADN et les amorces maisons par 1µL de Positive Control DNA (PCDNA) et 0.2µL de Positive Control Primers (PCP) par contrôle.
5. Placer les tubes dans l'incubateur approprié et démarrer la réaction. Les tests LAMP utilisant ces réactifs doivent être effectués à 63°C. Les essais peuvent fonctionner dans un intervalle de température de 60°C à 65°C avec une efficacité variable. Si un essai est positif, la détection du fluorochrome sera réalisée en 40 minutes. L'amplification du contrôle positif est détectable en 20 minutes.

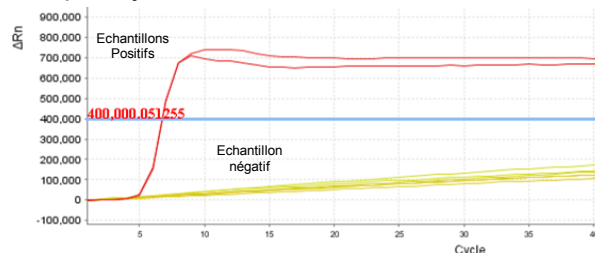
Note :

- Le colorant fluorochrome intercalant présent dans les culots de MAST ISOPLEX® DNA *Lyo* peut être lu avec le filtre FAM.
- Concentration des amorces recommandée dans un test de 10µL pour les amorces sélectionnées par l'utilisateur :
 F3 et B3 – 2.5pmol
 FIP et BIP – 20pmol
 LoopF et LoopB – 10pmol
- Si un volume de l'échantillon d'ADN supérieur à 1µL par réaction est nécessaire, le culot peut être resuspendu dans le volume approprié de Reconstitution Buffer et de molecular grade water pour maintenir la concentration du test au niveau des recommandations. Utiliser un plus faible volume de molecular grade water (voir la section Reconstitution des réactifs, point 1b) est la façon la plus efficace de réaliser cette procédure.

Interprétation des résultats

Résultats sur le thermocycleur : Un résultat positif est indiqué par la présence d'une courbe d'amplification et un résultat négatif est indiqué par une fluorescence sans amplification comme montré ci-dessous pour
 Echantillon positif : ADN positif MAST ISOPLEX® DNA *Lyo*
 Echantillon négatif : No-Template Control (NTC)

Exemple: Système ABI 7500 FAST REAL-TIME PCR



Contrôle de qualité

Il est recommandé de réaliser le contrôle de qualité des culots de MAST ISOPLEX® DNA *Lyo* en utilisant le Positive Control DNA (PCDNA), le Positive Control Primers (PCP), le Reconstitution Buffer (RB) et la molecular grade water (WTR) du kit pour chaque série de tests. Ces tests permettent de vérifier le bon fonctionnement des réactifs selon les spécifications ainsi que l'absence de contamination des réactifs du kit. Si les résultats des réactions de contrôle sont incorrects, vérifier l'absence de signes de détérioration ou de contamination des réactifs du kit avant utilisation.

Limites d'utilisation

Ces produits sont destinés à l'amplification d'échantillons d'ADN utilisant des méthodes d'extraction d'ADN internes et un ensemble d'amorces de fabrication interne défini. Le contrôle qualité détermine si les réactifs du kit et les contrôles fonctionnent et ne sont pas contaminés mais ne peut déterminer les problèmes potentiels que l'utilisateur peut rencontrer avec un ensemble d'amorces LAMP de fabrication interne et les échantillons pour l'extraction d'ADN. Le design des amorces et l'étape d'extraction des échantillons sont de la seule responsabilité de l'utilisateur. Les résultats obtenus avec ce kit doivent être évalués conjointement avec les autres données cliniques pertinentes lors du diagnostic d'une infection.

Bibliographie

Notomi T et al. Nucleic Acids Research (2000) 28 12, 63