

## MAST ISOPLEX® DNA Lyo

### DNA/LYO1/NCE 100 Tests

#### Verwendungszweck

Ein optimiertes isothermales Amplifikationskit, das die Herstellung von Loop-vermittelten isothermalen Amplifikationsreaktionen (LAMP) vereinfacht. Die DNA-Targets von Proben können mittels selbst definierten Primersets amplifiziert werden.

**NICHT FÜR DIE KLINISCHE DIAGNOSTIK GEEIGNET.  
NUR ZU FORSCHUNGSZWECKEN GEEIGNET.**

#### Inhalt

1. Zehn Röhrchen mit lyophilisiertem MAST ISOPLEX® DNA Lyo-Pellets (PEL). Jedes lyophilisierte Pellet ist für 10 Assay-Reaktionen ausreichend. Rote Verschlusskappe.
2. Ein Röhrchen mit lyophilisierten Positivkontroll-Primern (PCP). Blaue Verschlusskappe.
3. Ein Röhrchen mit lyophilisierter Positivkontroll-DNA (PCDNA) (10 pg/µl wenn rekonstituiert). Grüne Verschlusskappe.
4. Ein Röhrchen mit 1,5 ml 0,5 M Tris-Rekonstitutionspuffer (RB). Gelbe Verschlusskappe.
5. Ein Röhrchen mit 1,5 ml molekularem Wasser (WTR). Schwarze Verschlusskappe.

#### Lagerung und Haltbarkeit

1. Lagern Sie das ungeöffnete Kit bei 2°C bis 30°C bis zum auf dem Packungsetikett angegebenen Verfalldatum. Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen.
2. Nach der Rekonstitution sollten MAST ISOPLEX® DNA Lyo-Pellets, Positivkontrollprimer und Positivkontroll-DNA aliquotiert und bei -20°C gelagert werden. Lagern Sie alle anderen Komponenten bei 2°C bis 30°C. Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen.
3. Rekonstituierte MAST ISOPLEX® DNA Lyo-Pellets müssen innerhalb von 8 Wochen nach der Rekonstitution des Pellets verwendet werden.
4. Wenn das MAST ISOPLEX® DNA Lyo-Pellet am Tag der Rekonstitution in Tests nicht verwendet wird, können sie bei -20°C bis zur Verwendung gelagert werden. In kleinen Portionen aufbewahren, um mehrere Auftau-Zyklen zu vermeiden. Die Pelletaktivität ist bei dieser Temperatur für mindestens 8 Wochen stabil.
5. Rekonstituierte MAST ISOPLEX® DNA Lyo-Pellets sollten nicht mehr als 5-mal aufgetaut werden.
6. Die aus den Kits entnommenen Reagenzien können während des Versuchs bei 2°C bis 30°C aufbewahrt werden.
7. Alle Reagenzien sofort nach Gebrauch auf geeignete Lagerbedingungen bringen.
8. Die positive Kontroll-DNA (PCDNA) kann am Tag der Resuspension bei 2°C bis 8°C gelagert werden. Für die langfristige Lagerung in kleinen Aliquoten bei -20°C einfrieren, um mehrmaliges Auftauen zu verhindern.

#### Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

Es sollten Vorkehrungen getroffen werden, um eine Kontamination der Reagenzien im MAST ISOPLEX® DNA Lyo Kit und der Proben zu verhindern. Das Kit ist so konzipiert, dass es in Verbindung mit hausintern definierten Primer-Sets und nur von geschultem Laborpersonal verwendet werden kann.

Die Reaktionsröhrchen sollten nach der Zugabe von Reagenzien ständig geschlossen bleiben und ohne Öffnen nach Gebrauch entsorgt werden, entsprechend den örtlichen Gesundheits- und Sicherheitsrichtlinien. Um eine Kontamination mit dem amplifizierten Produkt zu vermeiden, öffnen Sie bitte niemals ein Probenröhrchen nach der Amplifikation.

Reaktionsgefäße nicht vortexen. Stellen Sie sicher, dass alle Reaktionsgefäße vor dem Gebrauch nicht zerkratzt oder zerbrochen sind.

#### Nicht mitgelieferte, benötigte Materialien

1. DNA-Proben- und Primer-Sets müssen vom Anwender bereitgestellt werden.
2. Die DNA aus der Probe sollte nach den üblichen Laborverfahren gewonnen werden.
3. DNase freie Materialien, wie Assay-Reagenzgläser, Pipetten und Pipettenspitzen.
4. Ein Gerät, das in der Lage ist, eine isothermale Inkubation der Reaktionsröhrchen bei der gewünschten Temperatur durchzuführen, wie etwa das Applied Biosystems (ABI) 7500 FAST REAL-TIME-PCR-System, das ESEQuant TS-System oder ein gleichwertiger interner Thermocycler. Das Gerät sollte über einen Fluoreszenzleser mit FAM-Kanal zur Erkennung von Amplifikationsprodukten verfügen.

#### Durchführung

##### Rekonstitution der Reagenzien

1. Rekonstituieren Sie das MAST ISOPLEX® DNA Lyo Pellet (PEL) wie folgt:
  - a. Geben Sie 20 µl Rekonstitutionspuffer (RB) hinzu.
  - b. Fügen Sie 68 µl molekular reines Wasser (WTR) zu dieser Suspension hinzu. (Damit wird der Rekonstitutionspuffer auf die finale Konzentration von 0,1 M eingestellt).
  - c. Mischen Sie den Inhalt durch sanftes Pipettieren des Reagenzes.
2. Rekonstituieren Sie die Positivkontroll-DNA (PCDNA) wie folgt:
  - a. Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, um sicherzustellen, dass die DNA sich auf dem Boden des Röhrchens befindet.
  - b. Geben Sie 50 µl molekular reines Wasser (WTR) hinzu und inkubieren Sie für 5 Minuten.
  - c. Mischen Sie den Inhalt durch mehrmaliges sanftes Pipettieren des Reagenzes.
3. Rekonstituieren Sie den Positivkontroll-Primer (PCP) wie folgt:
  - a. Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, um sicherzustellen, dass sich die Primer auf dem Boden des Röhrchens befinden.

- b. Geben Sie 20 µl molekular reines Wasser (WTR) hinzu und inkubieren Sie für 5 Minuten.
- c. Mischen Sie den Inhalt durch sanftes Pipettieren.

### Aufbau des Assays

Jedes rekonstituierte MAST ISOPLEX® DNA Lyo-Pellet kann für zehn Assayreaktionen (10µl pro Assay) verwendet werden.

Für jeden Assay:

1. In ein steriles DNase / RNase freies Reaktionsgefäß werden 8,8 µl rekonstituiertes MAST ISOPLEX® DNA Lyo und 0,2 µl hauseigene Primermischung und 1 µl DNA-Probe gegeben.
2. Zum Mischen vorsichtig pipettieren (nicht vortexen).
3. Für eine Negativkontrolle verwenden Sie 1 µl molekulares Wasser (WTR) pro Assay anstelle der Proben-DNA.
4. Ersetzen Sie für eine Positivkontrolle die Proben-DNA und die internen Primer mit 1 µl Positivkontroll-DNA (PCDNA) und 0,2 µl Positivkontroll-Primern (pro Assay).
5. Setzen Sie Assayreaktionsröhrchen in das gewählte Inkubationsgerät und starten Sie die Reaktion. LAMP-Assays unter Verwendung dieser Reagenzien sollten bei 63°C durchgeführt werden. Assays können in einem Temperaturbereich von 60°C bis 65°C mit gemischten Effizienzen arbeiten. Wenn ein Assay positiv ist, wird innerhalb von 40 Minuten eine Fluorochrom-Detektion nachgewiesen. Die Amplifikation der Positivkontrolle ist innerhalb von 20 Minuten nachweisbar.

### Hinweise:

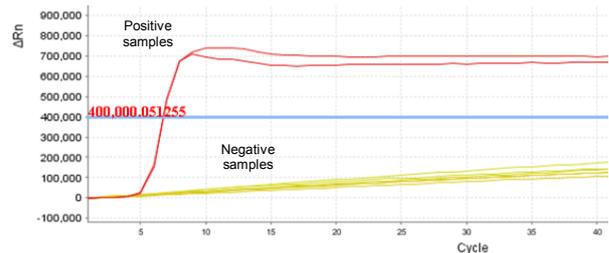
- Der interkalierende Fluorochrom-Farbstoff, der in den MAST ISOPLEX® DNA Lyo-Pellets vorliegt, kann durch eine FAM-Filtereinstellung gelesen werden. Empfohlene Primerkonzentration pro 10µl Test für hausinterne Primersets:  
 F3 und B3 - 2.5 pmol  
 FIP und BIP - 20 pmol  
 LoopF und LoopB - 10 pmol
- Wenn das DNA-Probenvolumen größer als 1 µl / Reaktion sein muss, kann das Pellet in einer geeigneten Menge an Rekonstitutionspuffer und Wasser resuspendiert werden, um die Konzentration des Assays auf optimale Richtlinien zu bringen. Die Verwendung eines kleineren Wasservolumens (siehe Assay Reagenz Rekonstitution Abschnitt, Punkt 1b) ist der effektivste Weg, dies zu tun.

### Interpretation der Ergebnisse

#### Thermocycler-Ergebnisse:

Ein positives Ergebnis wird durch die Anwesenheit einer Amplifikationskurve angezeigt. Ein negatives Ergebnis wird durch Fluoreszenz ohne Amplifikation innerhalb der Reaktionszeit, wie unten gezeigt, angezeigt  
 Positive Probe: MAST ISOPLEX® DNA Lyo Positive DNA  
 Negative Probe: keine Template-Kontrolle

Beispiel: ABI 7500 FAST REAL-TIME PCR System



### Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen, die Qualitätskontrolle von MAST ISOPLEX® DNA Lyo-Pellets unter Verwendung der Positivkontroll-DNA (PCDNA), der Positivkontrollprimer (PCP), des Pellet-Rekonstitutionspuffers und des im Kit mitgelieferten molekularen Wassers (WTR) durchzuführen. Diese Tests stellen sicher, dass die Reagenzien wie angegeben funktionieren und keine Kontamination der Kitreagenzien aufgetreten ist. Bei falschen Ergebnissen auf Anzeichen einer Verschlechterung oder Kontamination der Kit-Reagenzien vor der Verwendung achten. Verwenden Sie keine Kit Reagenzien, wenn Verschlechterung oder Verunreinigung vermutet wird.

### Einschränkungen

Diese Produkte sind zur Verwendung bei der Amplifikation der DNA-Probe unter Verwendung von internen DNA-Extraktionsverfahren und im Haus definierten Primersets vorgesehen. Qualitätskontrollen stellen sicher, dass die im Kit mitgelieferten Reagenzien und Kontrollen funktional und frei von Verunreinigungen sind. Hierbei kann nicht bestimmt werden, ob potenzielle Probleme durch die hausinternen LAMP-Primer-Sets und die Proben für die DNA-Extraktion bestehen. Primerentwurf und Probenentnahme sind alleinige Aufgabe des Endnutzers. Die mit diesem Kit erhaltenen Ergebnisse müssen zusammen mit anderen klinisch relevanten Daten bei der Diagnose einer Infektion berücksichtigt werden.

### Referenz

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