

MAST ISOPLEX® DNA Lyo Plus

DNA/LYO2/NCE 100.

Verwendungszweck

Das MAST ISOPLEX® DNA Lyo Plus-Kit ist ein Amplifikationskit, das die Durchführung von Loop-vermittelten isothermalen Amplifikationsreaktionen (LAMP) vereinfacht. DNA-Targets können durch den Einbau von in-house Primer-Sets amplifiziert werden. Das Kit enthält zwei Rekonstitutionspuffer, welche durch unterschiedliche Pufferbedingungen eine flexible Optimierung des LAMP-Assays ermöglichen.

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

Lieferumfang

1. Zehn Röhrrchen mit lyophilisierten MAST ISOPLEX® DNA Lyo Plus Pellets (PEL2). Jedes lyophilisierte Pellet reicht für 10 Assay-Reaktionen. Röhrrchen mit rotem Verschluss.
2. Ein Röhrrchen mit lyophilisiertem Positiv-Kontrollprimer (PCP2). Röhrrchen mit blauem Verschluss.
3. Ein Röhrrchen mit lyophilisierter Positiv-Kontroll-DNA (PCDNA2). (10 pg/µl, nach Rekonstitution). Röhrrchen mit grünem Verschluss.
4. Ein Röhrrchen mit 1,5 ml 0,5 M Tris- Rekonstitutionspuffer (RB). Röhrrchen mit gelbem Verschluss.
5. Ein Röhrrchen mit 1,5 ml 1 M CHES CAPSO Rekonstitutionspuffer (RB2). Röhrrchen mit orangefarbenem Verschluss.
6. Ein Röhrrchen mit 1,5 ml Wasser (WTR). Röhrrchen mit schwarzem Verschluss.

Lagerung und Haltbarkeit

1. Ungeöffnete Röhrrchen vor direkter Sonneneinstrahlung schützen und bei 2°C bis 30°C bis zum auf dem Verpackungsetikett angegebenen Verfallsdatum lagern.
2. Nach der Rekonstituierung sollten MAST ISOPLEX® DNA Lyo Plus Pellets, Positiv-Kontrollprimer und Positiv-Kontroll-DNA aliquotiert und bei - 20°C gelagert werden. Alle anderen Komponenten vor direkter Sonneneinstrahlung schützen und bei 2°C bis 30°C lagern.
3. Rekonstituierte MAST ISOPLEX® DNA Lyo Plus Pellets sind innerhalb von 8 Wochen nach der ersten Rekonstitution des Pellets zu verwenden.
4. Wenn der MAST ISOPLEX® DNA Lyo Plus Pellet am Tag der Rekonstitution nicht in Assays verwendet wurde, kann er bei - 20°C gelagert werden, bis er benötigt wird. In Aliquots aufbewahren, um mehrfache Auftau-Einfrier-Zyklen zu vermeiden. Die Pelletaktivität ist bei dieser Temperatur mindestens 8 Wochen lang stabil.
5. Rekonstituierte MAST ISOPLEX® DNA Lyo Plus Pellets nicht öfter als fünfmal einfrieren.
6. Die aus den Kits entnommenen Reagenzien können während des Versuchs bei 2°C bis 30°C aufbewahrt werden.
7. Alle Reagenzien nach Gebrauch wieder unter entsprechenden Lagerbedingungen aufbewahren.

8. Die Positiv-Kontroll-DNA (PCDNA2) kann bei Bedarf am Tag der Resuspension bei 2°C bis 8°C gelagert werden. Zur Langzeitlagerung nach der Rekonstitution in kleinen Aliquots bei - 20°C lagern, um mehrfache Auftau-Einfrier-Zyklen zu vermeiden.

Vorsichtsmaßnahmen

Um eine Kontamination der Reagenzien im MAST ISOPLEX® DNA Lyo Plus Kit und den Proben zu verhindern, sind entsprechende Vorkehrungen zu treffen. Das Kit ist für die Verwendung in Kombination mit in-house Primer-Sets hergestellt und nur von geschultem Personal zu verwenden. Dabei sollen Reaktionsgefäße nach Zugabe von Reagenzien stets geschlossen gehalten und nach Gebrauch gemäß den örtlichen Gesundheits- und Sicherheitsrichtlinien entsorgt werden, ohne sie zu öffnen. Um jegliche Kontamination mit dem amplifizierten Produkt zu vermeiden, niemals ein Probengefäß nach der Amplifikation öffnen. Reaktionsgefäße nicht vortexen. Es sollte sichergestellt werden, dass Reaktionsgefäße vor dem Gebrauch keine Kratzer und Risse aufweisen.

Zusätzlich benötigte Materialien

1. DNA-Proben und Primer-Sets sind vom Anwender bereitzustellen.
2. Proben-DNA gemäß Standard-Laborverfahren isolieren.
3. DNase-freie Komponenten wie Reaktionsröhrrchen, Pipetten und Pipettenspitzen verwenden.
4. Ein Gerät, das in der Lage ist, eine isothermale Inkubation von Reaktionsgefäßen bei der gewünschten Temperatur durchzuführen. Das Gerät sollte über einen Fluoreszenz-Detektor mit FAM-Detektionskanal zur Erkennung von Amplifikationsprodukten verfügen.

Durchführung

Rekonstitution des Assay-Reagenz

1. Rekonstitution des MAST ISOPLEX® DNA Lyo Plus Pellet (PEL2) entweder mit RB oder RB2.

Verwendung von RB (Gelbe Kappe):

- a. 20 µl des Rekonstitutionspuffers (RB) zufügen, um das Pellet zu resuspendieren.
- b. Zugabe von 66 µl molekular reinem Wasser (WTR).
- c. Den Inhalt durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mischen.

Verwendung von RB2 (Orangefarbene Kappe):

- a. 25 µl des Rekonstitutionspuffers (RB2) zufügen, um das Pellet zu resuspendieren.
 - b. Dazu werden 61 µl molekular reines Wasser (WTR) pipettiert.
 - c. Den Inhalt durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mischen.
2. Rekonstitution der Positiv-Kontroll-DNA (PCDNA2) wie folgt:
 - a. Das Röhrrchen kurz in einer Mikrozentrifuge zentrifugieren, um sicherzustellen, dass sich die DNA am Boden des Röhrrchens befindet.
 - b. 50 µl molekular reines Wasser (WTR) zugeben und 5 Minuten lang stehen lassen.
 - c. Den Inhalt durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mischen.

3. Rekonstitution der Positiv-Kontrollprimer (PCP2) wie folgt:
 - a. Das Röhrchen kurz in einer Mikrozentrifuge zentrifugieren, um sicherzustellen, dass sich die Primer am Boden des Röhrchens befinden.
 - b. 20 µl molekular reines Wasser (WTR) zugeben und 5 Minuten lang stehen lassen.
 - c. Den Inhalt durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mischen.

Assay-Set-Up

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

Für jeden Assay durchzuführen:

1. In ein steriles, DNase/RNase-freies Reaktionsgefäß werden 8,6 µl rekonstituiertes MAST ISOPLEX[®] DNA Lyo Plus und 0,4 µl in-house Primermix sowie 1 µl DNA-Probe pipettiert.
2. Vorsichtig pipettieren (nicht vortexen), um zu mischen.
3. Für eine Negativ-Kontrolle eine No-Template-Kontrolle (NTC) vorbereiten, in der pro Assay 1 µl Proben-DNA durch 1 µl molekulare reines Wasser (WTR) ersetzt wird.
4. Für eine Positiv-Kontrolle die Proben-DNA und die in-house Primer durch 1 µl Positiv-Kontroll-DNA (PCDNA2) und 0,4 µl Positiv-Kontroll-Primer (PCP2) pro Assay ersetzen.
5. Reaktionsgefäße in das entsprechende Gerät stellen und die Reaktion starten. LAMP-Assays, die mit diesen Reagenzien durchgeführt werden, sollten bei 63°C erfolgen. Assay-Reaktionen können in einem Temperaturbereich von 60°C bis 65°C mit variierenden Wirkungsgraden ablaufen.
6. Wenn ein Assay positiv ist, wird der Fluorochromnachweis bei Verwendung von RB innerhalb von 40 Minuten detektiert. Die Amplifikation der Positiv-Kontrolle mittels RB ist innerhalb von 20 Minuten detektierbar. Bei Verwendung von RB2 erfolgt die Fluorochrom-Detektion innerhalb von 40 Minuten. Die Amplifikation der Positiv-Kontrolle mit RB2 ist innerhalb von 30 Minuten nachweisbar.

Hinweise

- Der in den MAST ISOPLEX[®] DNA Lyo Plus Pellets enthaltene interkalierende Fluorochromfarbstoff kann mit einer FAM-Filtereinstellung detektiert werden.
- Empfohlene Primerkonzentration pro 10 µl Assay für in-house Primer-Sets:
 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 adäquaten Menge an Rekonstitutionspuffer und Wasser entsprechend des Protokolls resuspendiert werden, um die gewünschte Konzentration zu erhalten. Dies ist am einfachsten durch Reduktion des Wasservolumens (siehe Abschnitt Rekonstitution von Assay-Reagenzien, Punkt 1b) zu erreichen.

Interpretation der Ergebnisse

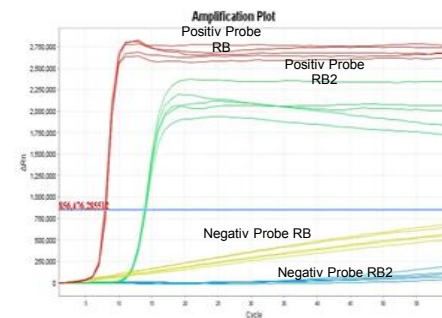
Thermocycler-Ergebnisse:

Ein positives Ergebnis wird durch das Vorhandensein einer Amplifikationskurve und ein negatives Ergebnis durch Fluoreszenz ohne Amplifikation innerhalb der Reaktionszeit angezeigt, wie in folgender Abbildung dargestellt ist:

Positives Signal: MAST ISOPLEX[®] DNA Lyo Plus Positive DNA

Negatives Signal: keine Template-Kontrolle

Beispiel: ABI 7500 FAST REAL-TIME PCR-System



Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen, dass pro Testlauf eine Qualitätskontrolle des MAST ISOPLEX[®] DNA Lyo Plus Pellets mit Hilfe der Positiv-Kontroll-DNA (PCDNA2), des Positiv-Kontrollprimers (PCP2), des molekularen reinen Wassers (WTR) und einem der im Kit enthaltenen Pelletrekonstitutionspuffer (RB oder RB2) durchgeführt wird. Diese Tests stellen sicher, dass die Reagenzien die angegebenen Assay-Eigenschaften erbringen und keine Kontamination der Kit-Reagenzien vorliegt. Wenn Kontrollreaktionen zu falschen Ergebnissen führen, sollte vor der Anwendung geprüft werden, ob Anzeichen von Verfall oder Kontamination der Kit-Reagenzien vorliegen.

Kit-Reagenzien bei Verdacht auf Verfall oder Kontamination besteht nicht verwenden.

Limitierungen

Diese Produkte werden für die Amplifikation von DNA-Proben unter Verwendung von in-house DNA-Extraktionsmethoden und in-house Primer-Sets verwendet. Die Qualitätskontrolle zeigt, ob Kit-Reagenzien und Kontrollen funktionsfähig und kontaminationsfrei sind, kann aber keine potenziellen Probleme feststellen, die der Anwender mit in-house LAMP-Primer-Sets und Proben für die DNA-Extraktion haben könnte. Primer-Design und Probenentnahme liegen in der alleinigen Verantwortung des Endverbrauchers. Zur Diagnose das Messergebnis mit anderen Laborwerten und klinischen Befunden zusammen interpretieren.

References

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