

## **MAST ISOPLEX® DNA / RNA Extraction Kit**

MAST ISOPLEX® DNA / RNA Extraction Kit


**REF**

67DNAEXA

960 Tests

### **Gebrauchsanweisung / Instructions for Use / Notice d'utilisation**

**Nur zur Verwendung durch Fachpersonal /  
For professional use only /  
Exclusivement pour un usage professionnel**

	Deutsch	Seiten	02–05
	English	Pages	06–09
	Français	Pages	10–13

## MAST ISOPLEX® DNA / RNA Extraction Kit

Kit zur Extraktion von Nukleinsäuren (NA) für die weitere Verwendung in MAST ISOPLEX Testsystemen oder anderen Amplifikationsmethoden.

### Verwendungszweck

Der Kit ist geeignet zur NA Extraktion von Bakterien, Viren und Protozoen.

Als Ausgangsmaterial können flüssige, humane Abstrichproben, Proben von Kulturplatten sowie Stuhl-/ Urin- /Blutproben verwendet werden. Der Kit ist für die manuelle und automatische Abarbeitung auf dem KingFisher Flex geeignet. Auf anderen Liquid-handling Systemen wie z.B. Hamilton Systemen ist eine Adaptation ebenfalls möglich (Bitte kontaktieren Sie die/den jeweilige(n) Applikationsspezialist\*in).

### Wichtiger Hinweis zur Gebrauchsanweisung

Bei etwaigen Änderungen der Gebrauchsanweisung wird die Versionsnummer in der Fußzeile des Deckblatts aktualisiert. Für einen Zeitraum von 3 Monaten nach Vergabe der neuen Versionsnummer werden die Änderungen durch Beilage eines farbigen Beiblatts gekennzeichnet.

Bitte stellen Sie sicher, dass Sie immer mit der aktuellen Gebrauchsanweisung arbeiten.

### Testprinzip

Bead-basierte Methoden sind einfache und zuverlässige Methoden zur Extraktion von Nukleinsäuren (NA). Zunächst wird die Probe lysiert. Unter optimalen Bedingungen binden die NA selektiv an die Oberfläche der Magnetbeads, während andere Komponenten in Lösung bleiben. Gereinigte NA können direkt in unterschiedlichen molekularbiologischen Anwendungen (Sequenzierung, PCR, etc.) eingesetzt werden. Die Extraktion kann manuell, halbautomatisch oder vollautomatisch erfolgen.

### Packungsinhalt

1. **LYSIS** Lysis Puffer V  
1 x 250 mL
2. **PROT K** Proteinase K  
16 x für je 1,5 mL
3. **BINDING** Bindungs-Puffer V  
1 x 650 mL
4. **MAG** MAG Suspension F  
10 x 1,1 mL
5. **WASH 1** Waschlösung HS  
1 x 350 mL (Endvolumen 700 mL)

6. **WASH 2** Waschlösung LS  
2 x 130 mL (Endvolumen je 650 mL)
7. **WATER** RNase-freies Wasser  
4 x 30 mL
8. **Gebrauchsanweisung**

### Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

1. Vor der Testdurchführung sorgfältig die Gebrauchsanweisung lesen. Die Testdurchführung nicht ohne Validierung modifizieren.
2. Keine Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
3. Die allgemeinen Arbeitsschutzrichtlinien für das Arbeiten mit potentiell infektiösen Materialien einhalten. Es wird empfohlen, entsprechende Schutzkleidung zu tragen. Den Test immer in geeigneten Laborräumen abarbeiten.
4. Keine Reagenzien unterschiedlicher Chargen mischen, da diese in jeder Charge aufeinander abgestimmt sind.
5. Eine Kontamination der Reagenzien vermeiden; die Flaschen immer wieder mit den richtigen Deckeln verschließen. Zum Pipettieren immer eine neue Pipettenspitze für jeden Arbeitsschritt verwenden.
6. Probenmaterialien und Einmalartikel, die mit dem Probenmaterial in Kontakt gekommen sind, entsprechend gängiger Vorschriften zur Entsorgung potentiell infektiösen Materials vernichten. Arbeitsflächen mit einem geeigneten Flächendesinfektionsmittel gemäß der Anwendungsvorschrift dekontaminieren. Glasgefäße o. ä. können bei 121 °C autoklaviert werden.
7. Wenn Pufferflaschen beschädigt oder undicht sind, sind beim Entsorgen der Flaschen Handschuhe und Schutzbrille zu tragen, um Verletzungen zu vermeiden.
8. Nachfolgend sind die Risiko- und Sätze der Europäischen Gemeinschaft für Komponenten des MAST ISOPLEX® DNA / RNA Extraction Kit aufgeführt.

Bindungs-Puffer V: enthält 2-Propanol; leicht entzündlich, reizend (R11, 36, 67, 7, 16, S24/25/26)

Proteinase K: reizend, reizend, sensibilisierend. Gefahren- und Sicherheitshinweise: R36/37/38-42; S22-24-26-26-37/38

Waschlösung HS: enthält Guanidiniumthiocyanat: schädlich. Gefahren- und Sicherheitshinweise: R20/21/22-32; S13-26-36-46

Details sind im Sicherheitsdatenblatt (SDS) aufgeführt.

## Stabilität und Lagerung

### Wichtig

Lyophilisierte **Proteinase K** bei 4–8 °C lagern!

Nicht verwendete, gelöste Proteinase K in Aliquots aufteilen und bei -20 °C lagern. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen reduziert die Aktivität erheblich!

Die lyophilisierte Proteinase K kann ab Herstellung bis zu dem auf der Packung genannten Haltbarkeitsdatum verwendet werden, wenn sie bei 4–8 °C aufbewahrt wird.

Mag Suspension F bei 4–8 °C lagern, Einfrieren vermeiden!

Alle anderen Komponenten bei Raumtemperatur lagern.

### Zusätzlich benötigte Materialien

1. RNase-freie Tubes.
2. 96–99,8 % Ethanol, unvergällt oder methyliert.

### Erste Schritte

1. 350 mL 96–99,8 % Ethanol in die Flasche **Waschlösung HS** geben, gründlich mischen und Flasche immer fest verschlossen halten!
2. 520 mL 96–99,8 % Ethanol in jede Flasche **Waschlösung LS** geben, gründlich mischen und Flasche immer fest verschlossen halten!
3. **Proteinase K** durch Zugabe von 1,5 mL ddH<sub>2</sub>O lösen, gründlich mischen und wie beschrieben lagern!

### Probenvorbereitung

#### Flüssige-, Urin- und Blutproben:

- Die Proben können direkt extrahiert werden.

#### Abstrichproben:

##### • Testsysteme mit Flüssigmedien:

Das Flüssigmedium kann direkt extrahiert werden.

##### • Abstrichproben ohne Flüssigmedium

Tupfer in Röhrchen mit physiologischer Kochsalzlösung 1 mL (0,9 % NaCl) oder PBS überführen und unter ständigem Schütteln für 20 Minuten inkubieren.

Tupfer ausdrücken und entfernen, anschließend 200 µL der flüssigen Probe direkt extrahieren.

#### Proben von Kulturplatten:

- 3–5 frische Kolonien einer Übernachtskultur in 200 µL PBS, suspendieren, anschließend direkt extrahieren.

#### Stuhlproben:

- 50–100 mg Stuhlprobe in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß geben.
- 250 µL PBS hinzufügen (nicht im Kit enthalten), 10 sec vortexen.
- 3 min bei ca. 16000 rpm (ca. 21000 x g) zentrifugieren
- 200 µL Überstand anschließend direkt extrahieren.

### Gewebeproben:

- Zu 5–10 mg Gewebeprobe 400 µL ddH<sub>2</sub>O (RNase-frei) oder PBS pipettieren und homogenisieren (Gewebehomogenisator).
- Homogenat 2 min bei 10.000 x g zentrifugieren.
- 200 µL des Überstandes anschließend direkt extrahieren.

Die vorbereiteten Proben werden entweder auf dem KingFisher Flex oder manuell extrahiert.

### KingFisher Flex: Extraktion von Nukleinsäuren

#### Vor dem Start

1. Sicherstellen, dass **Waschlösung HS**, **Waschlösung LS** und, **Proteinase K** gemäß Gebrauchsinformation hergestellt wurden.
2. **MAG Suspension F** sehr gut für 1 Minute vortexen.
3. Einfrieren und Auftauen der Ausgangsmaterialien vermeiden.
4. Interne Reaktionskontroll-DNA /-RNA gemäß der Gebrauchsinformation des verwendeten Amplifikationskits dem Lysis Puffer V zufügen.

#### Extraktion

1. **200 µL Lysis Puffer V** (optional mit Extraktions-(Interner) Kontrolle) in die als „Lysis-Platte“ beschriftete Deep Well (DW) Platte pipettieren.
2. **200 µL der flüssigen Probe** (Probenvorbereitung) in die Lysis-Platte pipettieren.
3. **20 µL Proteinase K** jedem Probenwell zufügen.
4. Kennzeichnen und vorbereiten der Deep Well Platten.

Platte	Label	Inhalt
Deep Well	Lyseplatte	Lysierte Probe (und Lysis Puffer V)
Deep Well	Waschplatte 1	500 µL Waschlösung HS
Deep Well	Waschplatte 2	500 µL Waschlösung LS
Deep Well	Waschplatte 3	500 µL Waschlösung LS
96-well Platte	Elutionsplatte	80 µL RNase-freies Wasser
Deep Well	Spitzenplatte	96 Well Spitzen

5. Laden von DW-Platten für den KingFisher FLEX Gerät einschalten, das Protokoll "Mast DNA\_RNAex" auf dem KingFisher Flex -Instrument wählen und den Lauf starten.

6. Den Anweisungen folgen und die vorgefüllten Deep Well Platten nacheinander in die jeweilige Plattenhalterung platzieren
  - Spitzenplatte
  - Elutionsplatte
  - Waschplatte 3
  - Waschplatte 2
  - Waschplatte 1
  - Lysisplatte (enthält Probe, Lysis Puffer V und Proteinase K)
7. Starten der automatischen Extraktion
  - a) Der automatisierte Extraktionsprozess beginnt mit der Probenlyse. Nach der Probenlyse stoppt der automatisierte Lauf.
  - b) Nachdem Stoppen, die "Lyseplatte" aus dem Gerät nehmen, den lysierten Proben 10 µL gut gemischte MAG Suspension F und 500 µL Bindungs-Puffer V zufügen.
 

**HINWEIS:** MAG Suspension F durch 1-minütiges vortexen gut mischen.
  - c) Nach Zugabe der MAG Suspension F und des Bindungs-Puffers V die "Lyseplatte" wieder in den KingFisher Flex stellen und den Extraktionsvorgang durch erneutes Starten des KingFisher Flex fortsetzen (gemäß Anleitung auf dem Display des KingFisher Flex).

**WICHTIGER HINWEIS:** Nach Abschluss des Extraktionsprotokolls enthält die Elutionsplatte die isolierte DNA/RNA. Lagern Sie die DNA/RNA unter geeigneten Bedingungen. Die Lagerung der extrahierten RNA wird bei -80 °C empfohlen.

Wenn das Eluat ein Carryover von magnetischen Partikeln enthält, die Platte auf einen Magneten stellen oder die Platte 3 Minuten lang bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren. Den Überstand mit DNA/RNA in eine neue Platte pipettieren.

## Manuell: Extraktion von Nukleinsäuren

### Vor dem Start

1. Sicherstellen, dass **Waschlösung HS**, **Waschlösung LS** und, **Proteinase K** gemäß Gebrauchsinformation hergestellt wurden.
2. **MAG Suspension F** sehr gut für 1 Minute vortexen.
3. Einfrieren und Auftauen der Ausgangsmaterialien vermeiden.
4. Optional: Heizblock auf 60 °C vorheizen
5. Interne Reaktionskontroll-DNA /-RNA gemäß der Gebrauchsinformation des verwendeten Amplifikationskits dem Lysis Puffer V zufügen.

### Extraktion

1. **200 µL Probe der flüssigen Probe** (Probenvorbereitung) und **200 µL Lysis Puffer V** in ein **RNase-freies Tube (1,5 mL)** geben. **20 µL Proteinase K** zupipettieren und durch Auf- und Abpipettieren gut mischen.

2. Probe bei Raumtemperatur für 15 min inkubieren.
 

**Hinweis:** Probe während der Inkubation mehrfach mischen. Fehlendes Mischen beeinträchtigt die Lyseeffizienz.
3. **400 µL Bindungs-Puffer V** und **10 µL MAG Suspension F** in das Reaktionsgefäß pipettieren. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mischen. 30 sec inkubieren und erneut durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mischen. Das Reaktionsgefäß in den Magnetständer einsetzen, 20 sec inkubieren und anschließend die Flüssigkeit vorsichtig weitestgehend entfernen.
 

**Hinweis:** Magnetbeads nicht abpipettieren.
4. Das Reaktionsgefäß aus dem Magnetständer nehmen und **500 µL Waschlösung HS** zugeben. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gut mischen, bis alle Magnetbeads gelöst sind. Das Reaktionsgefäß in den Magnetständer einsetzen, 20 sec inkubieren und anschließend die **Flüssigkeit** vorsichtig weitestgehend abpipettieren.
 

**Hinweis:** Magnetbeads nicht abpipettieren.
5. Das Reaktionsgefäß aus dem Magnetständer nehmen und **500 µL Waschlösung LS** zugeben. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut mischen, bis alle Magnetbeads gelöst sind. Das Reaktionsgefäß in den Magnetständer einsetzen, 20 sec inkubieren und anschließend die Flüssigkeit vorsichtig so weit wie möglich abpipettieren.
 

**Hinweis:** Magnetbeads nicht abpipettieren.
6. Das Reaktionsgefäß aus dem Magnetständer nehmen und **500 µL Waschlösung LS** zugeben. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut mischen, bis alle Magnetbeads gelöst sind. Das Reaktionsgefäß in den Magnetständer einsetzen, 20 sec inkubieren und anschließend die Flüssigkeit vorsichtig weitestgehend abpipettieren.
 

**Hinweis:** Magnetbeads nicht abpipettieren.

Restalkohol mit einer Pipette so weit wie möglich aus dem Reaktionsgefäß und auch aus dem Deckel entfernen.
7. Das Reaktionsgefäß aus dem Magnetständer nehmen und offen bei Raumtemperatur lufttrocknen, bis der Alkohol vollständig verdunstet ist (ca. 35 - 45 min), alternativ für 10–15 min bei 60 °C trocknen.
 

**Hinweis:** Magnetbeads nicht abpipettieren.
8. Die Magnetbeads in **80 µL RNase-freiem Wasser** durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendieren. 1 min inkubieren und erneut durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendieren. Das Reaktionsgefäß in den Magnetständer einsetzen, 20 sec inkubieren und anschließend die Flüssigkeit mit gereinigten Nukleinsäuren vollständig in ein neues RNase-freies Tube überführen.
 

**Hinweis:** Magnetbeads nicht mit pipettieren.

Die extrahierten Nukleinsäuren sind für die weitere Verwendung vorbereitet. Sie können kurzfristig bei +4 °C für längere Aufbewahrung bei -20 °C gelagert werden.

2. Assaydauer: Ca. 60 min oder ca. 45 min nach der Lyse.
3. Bindungskapazität: > 50 µg DNA.
4. Die durchschnittliche Ausbeute an Nukleinsäuren beträgt bis zu 35 µg.

## Assay Daten

Produktspezifikationen:

1. Ausgangsmaterial:  
Bis zu 1 x 10<sup>9</sup> Gram+ oder Gram- Bakterien

## Troubleshooting

Problem / Ursache	Kommentare und Vorschläge
<b>Unzureichende Lyse des Ausgangsmaterials:</b>	
Unzureichender Erregeraufschluss oder Homogenisation	Nach der Lyse zentrifugieren um Debris zu pelletieren. Den Überstand für das weitere Protokoll verwenden. Menge des Ausgangsmaterials reduzieren.
<b>Zu wenig oder keine RNA eluiert:</b>	
Unzureichende Disruption oder Homogenisation	Menge des Ausgangsmaterials reduzieren, Überladung reduziert die Ausbeute.
<b>DNA Kontamination:</b>	
Zu große Menge an Ausgangsmaterial	Menge des Ausgangsmaterials reduzieren.
Unzureichende Lyse des Ausgangsmaterials	Vorgeschlagene Lysemethode für "Flüssigmedien" verwenden.
<b>Abbau der RNA:</b>	
RNA-Probe unsachgemäß behandelt bzw. gelagert	Frisches Ausgangsmaterial verwenden. Erste Schritte des Protokolls schnell ausführen.
RNase Kontamination der Lösungen, Tubes oder sonstiger verwendeter Materialien	Verwendung steriler, RNase-freier Filterspitzen. Vor jeder Aufarbeitung Pipetten und benötigtes Material reinigen. Immer Handschuhe tragen!
<b>Verschlechterung der RNA-Ausbeute bei Downstreamanwendung:</b>	
Salzübertragung während der Elution	Sicherstellen, dass die Waschlösungen HS und LS temperiert sind (Raumtemperatur). Konzentrate der Waschlösungen auf Präzipitate prüfen, gegebenenfalls diese durch vorsichtiges Erwärmen lösen.

## MAST ISOPLEX® DNA / RNA Extraction Kit

Kit for extraction of nucleic acids (NA) for further use in MAST ISOPLEX test systems or other amplification methods.

### Intended Use

The kit is suitable for NA extraction of bacteria, viruses and protozoa.

Starting material can be liquid, human swab samples, samples from culture plates as well as stool, urine or blood samples. The kit is suitable for automatic processing on KingFisher Flex. On other liquid handling systems like Hamilton systems it can be adapted as well (please contact the corresponding application specialist).

### Important Note for Use of these Kit Instructions

Any assay relevant changes to the kit instructions for use (IFU) will lead to a change of the version number at the bottom on the last page. All changes made will be identified on a separate sheet added to the IFU for a period of three months from the date of a change of the version. Please ensure that the latest version of the IFU is used for the assay procedure.

### Principle of the Test

Bead-based methods are simple and reliable methods for the extraction of nucleic acids (NA). First, the sample is lysed. Under optimal conditions, the NA bind selectively to the surface of the magnetic beads, while other components remain in solution. Purified NA can be used directly in various molecular biological applications (sequencing, PCR, etc.). Extraction can be performed manually, semi-automatically or fully automatically.

### Kit Contents

1. **LYSIS** Lysis Solution V  
1 x 250 mL
2. **PROT K** Proteinase K  
for 16 x 1.5 mL each
3. **BINDING** Binding Solution V  
1 x 650 mL
4. **MAG** MAG Suspension F  
10 x 1.1 mL
5. **WASH 1** Washing Solution HS  
1 x 350 mL (final volume 700 mL)
6. **WASH 2** Washing Solution LS  
2 x 130 mL (final volume 650 mL each)
7. **WATER** RNase-free Water  
4 x 30 mL
8. Instructions for use

### Warning and Precautions

1. Read instructions carefully before conducting the assay. Do not modify the procedure without prior validation.
2. Do not use reagents beyond the expiry date.
3. Comply with the general health and safety guidelines for working with potentially infectious materials. Wear appropriate protective clothing and use appropriate lab facilities.
4. Do not mix reagents between different lots, as reagents have been calibrated for each batch.
5. Do not cross-contaminate reagents or interchange caps on bottles. Use a separate pipette or pipette tips for each sample and reagent.
6. Samples and contaminated disposables should be disposed according to relevant disposal directives and regulations for infectious materials. For the decontamination of surfaces use suitable surface disinfectants. Contaminated glassware should be autoclaved at 121 °C.
7. If buffer bottles are damaged or leaking, wear gloves and protective goggles when discarding the bottles in order to avoid any injuries.
8. Below the European Community risk and safety phrases for components of the MAST ISOPLEX® DNA / RNA Extraction Kit to which they apply are listed.

Binding Solution V: contains 2-propanol; highly flammable, irritant (R11, 36, 67, 7, 16, S24/25/26)

Proteinase K: irritant, sensitizing. Risk and safety phrases: R36/37/38-42; S22-24-26-37/38

Washing Solution HS: contains guanidinium thiocyanate: harmful. Risk and safety phrases: R20/21/22-32; S13-26-36-46

For details please refer to the SDS.

### Stability and Storage

#### Important

Store lyophilized **Proteinase K** at 4–8 °C!

Divide unused, dissolved Proteinase K into aliquots and store at -20 °C. Repeated freezing and thawing will reduce the activity dramatically!

The lyophilized Proteinase K may be used from manufacture until the expiry date indicated on the package, if stored at 4-8 °C.

Store the suspension of Mag F at 4-8 °C, avoid freezing!

All other components are stored at room temperature.

#### Components not included in the kit

1. RNase free tubes.
2. 96–99.8 % ethanol, non-denatured or methylated.

## Initial steps

1. Add 350 mL of 96-99.8 % ethanol to the bottle **Washing Solution HS**, mix thoroughly and keep the bottle always firmly closed!
2. Add 520 mL of 96-99.8 % ethanol to each bottle **Washing Solution LS**, mix thoroughly and keep the bottle always firmly closed!
3. Dissolve **Proteinase K** by addition of 1.5 mL of ddH<sub>2</sub>O, mix thoroughly and store as described!

## Sample Preparation

### Liquid / urine / blood samples:

No specific preparation is necessary. Samples can be used directly for extraction.

### Swab samples:

- **Test systems with liquid media:**

The liquid medium can be used directly for extraction.

- **Swab samples without liquid medium**

Transfer swabs to tubes containing 1 mL (0,9 % NaCl) physiological saline solution or PBS and incubate for 20 minutes, shaking continuously.

Squeeze out and remove swab, then 200 µL of liquid sample can be used directly for extraction.

### Agar plates:

- Pick a few (3-5) fresh overnight colonies, resuspend in 200 µL PBS and used it directly for extraction.

### Fecal samples:

- Add approx. 50-100 mg stool sample into a 1.5 mL reaction tube.
- Add 250 µL PBS (not included in kit) and vortex for 10 sec
- Spin at approx. 16000 rpm (approx. 21000 x g) for 3 min
- 200 µL supernatant can be used directly for extraction.

### Tissue samples:

- Pipette to 5-10 mg tissue sample 400 µL ddH<sub>2</sub>O (RNase-free) or PBS and homogenize (tissue homogenizer)
- Centrifuge the homogenate for 2 min at 10,000 x g.
- 200 µL supernatant can be used directly for extraction.

The prepared samples are extracted on the KingFisher Flex or manually.

## KingFisher Flex: Extraction of Nucleic Acids

### Recommended steps before starting

1. Ensure that the **Washing Solution HS**, **Washing Solution LS** and, **Proteinase K** have been prepared according to the instruction.

2. Mix **MAG Suspension F** very well by vortexing for 1 minute.
3. Avoid freezing and thawing of starting materials.
4. Add Internal control DNA / RNA according the IFU of the amplification test to Lysis Solution V.

### Extraction process

1. Transfer **200 µL Lysis Solution V** (optional with extraction / internal control) into of the Deep Well (DW) Plate labelled with "Lysis Plate".
2. Add **200 µL of the liquid sample** (sample preparation) into the DW Plate containing Lysis Solution V (optional with extraction / internal control).
3. Add **20 µL Proteinase K** to each well used.
4. Labelling and prefilling of Deep Well Plates

Plate	Label	Content
Deep Well	Lysis Plate	Lysed samples (including Lysis Solution V)
Deep Well	Washing Plate 1	500 µL Washing Solution HS
Deep Well	Washing Plate 2	500 µL Washing Solution LS
Deep Well	Washing Plate 3	500 µL Washing Solution LS
96 Plate	Elution Plate	80 µL RNase-free Water
Deep Well	Tip Plate	96 Well Tips

5. Loading Deep Well Plates to KingFisher Flex Turn on and select the protocol "Mast DNA\_RNAex" on the KingFisher Flex instrument and start the run.
6. Follow the instruction and load prefilled Deep Well Plates successive to the sample tray:
  - Tip Comb Plate
  - Elution Plate
  - Washing Plate 3
  - Washing Plate 2
  - Washing Plate 1
  - Lysis Plate (containing sample, Lysis Solution V and Proteinase K)
7. Starting the automated extraction
  - a. The automated extraction process starts with sample lysis. After sample lysis the automated run stops.
  - b. After the device has stopped, take the "Lysis Plate" out of the device and add 10 µL of well mixed MAG Suspension F and 500 µL of Binding Solution V to the lysed samples. **NOTE:** Mix the MAG Solution F well by vortexing for 1 minute.
  - c. After addition of MAG Suspension F and Binding Solution V place the "Lysis Plate" back to the KingFisher Flex and continue the extraction

process by start the KingFisher Flex again (you will find the instruction on the display of the KingFisher Flex).

**IMPORTANT NOTE** After finishing the extraction protocol, the Elution Plate contains the isolated DNA/RNA. Store the DNA/RNA under adequate conditions. We recommend storing the extracted RNA at -80 °C.

If the eluate contains carryover of magnetic particles, place the plate on a magnet or centrifuge the plate at maximum speed for 3 minutes. Pipet the supernatant with DNA/RNA into a new plate.

## Manually: Extraction of Nucleic Acids

### Recommended steps before starting

1. Ensure that the **Washing Solution HS**, **Washing Solution LS** and, **Proteinase K** have been prepared according to the instruction.
2. Mix **MAG Suspension F** very well by vortexing for 1 minute.
3. Avoid freezing and thawing of starting materials.
4. Optional: Heat the heater to 60 °C
5. Add Internal control DNA / RNA according the IFU of the amplification test to Lysis Solution V.

### Extraction process

1. Add **200 µL sample** and **200 µL Lysis Solution V** in a **RNase free tube (1.5 mL)**. Add **20 µL Proteinase K** to the sample and mix well by pipetting up and down.
2. Incubate the sample at room temperature for 15 min.  
**Note:** Mix the sample several times during incubation. No mixing will reduce the lysis efficiency.
3. Add **400 µL Binding Solution V** and **10 µL MAG Suspension F** in the reaction tube.  
Mix the sample by pipetting up and down several times. Wait for 30 sec and mix again by pipetting up and down several times.  
Place the reaction tube in magnetic rack. Wait for 20 sec and carefully remove the liquid as much as possible.  
**Note:** Do not remove the magnetic beads.
4. Take the reaction tube out of magnetic rack and add **500 µL Washing Solution HS**. Mix well by pipetting up and down several times until all magnetic beads are dissolved well.  
Place the reaction tube in magnetic rack. Wait for 20 sec and carefully remove the **liquid** as much as possible.  
**Note:** Do not remove the magnetic beads.
5. Take the reaction tube out of magnetic rack and add **500 µL Washing Solution LS**. Mix well by pipetting up and down several times until all magnetic beads are dissolved well.

Place the reaction tube in magnetic rack. Wait for 20 sec and carefully remove the liquid as much as possible.

**Note:** Do not remove the magnetic beads.

6. Take the reaction tube out of magnetic rack and add **500 µL Washing Solution LS**. Mix well by pipetting up and down several times until all magnetic beads are dissolved well.

Place the reaction tube in magnetic rack. Wait for 20 sec and carefully remove the liquid as much as possible.

**Note:** Do not remove the magnetic beads.

Remove residual alcohol by pipetting from the reaction tube and also from the lid as much as possible.

7. Take the reaction tube out of magnetic rack and air dry with open lid at room temperature until alcohol is evaporated completely (approx. 35 to 45 min) or 10–15 min at 60 °C

**Note:** Do not remove the magnetic beads.

8. Resuspend the magnetic beads in **80 µL RNase-free water** by pipetting up and down several times. Wait for 1 min and resuspend again the magnetic bead by pipetting up and down.

Place the tube into the magnetic rack and wait for 20 sec and transfer the liquid sample completely into the new RNase free tube.

**Note:** Avoid carryover of magnetic beads.

The extracted nucleic acids are ready to use for downstream application. For short-term store the extracted nucleic acids at +4 °C. For long-term storage at -20 °C is recommended.

## Assay Data

Product specifications:

1. Starting material:  
Up to 1 x 10<sup>9</sup> cells of Gram+ or Gram- bacteria.
2. Time for isolation: Approximately 60 min or approximately 45 min after the lysis step.
3. Binding capacity: > 50 µg NA.
4. The typical yield is sufficient for amplification procedures, up to 35 µg.



## Troubleshooting

Problem / probable cause	Comments and suggestions
<b>Poor lysis of starting material:</b>	
Insufficient disruption or homogenization	After lysis centrifuge lysate to pellet debris and continue with the protocol using the supernatant. Reduce amount of starting material.
<b>Little or no total RNA eluted:</b>	
Insufficient disruption or homogenization	Reduce amount of starting material. Overloading reduces yield!
<b>DNA contamination:</b>	
Too much starting material	Reduce amount of starting material.
Incorrect lysis of starting material	Use the recommended techniques for lysis of liquid media.
<b>Total RNA degraded:</b>	
RNA sample inappropriately handled or stored	Ensure that the starting material is fresh! Ensure that the protocol, especially the first steps, has been performed quickly.
RNase contamination of solutions; Receiver Tubes or other materials used.	Use sterile, RNase-free filter tips. Before every preparation clean up the pipette, the devices and the working place. Always wear gloves!
<b>Total RNA does not perform well in downstream applications:</b>	
Salt carryover during elution	Ensure that Washing Solution HS and Washing Solution LS are at room temperature. Checkup Washing Solution for salt precipitates. If there are any precipitate dissolves these precipitate by carefully warming.

## Kit d'extraction MAST ISOPLEX® ADN / ARN

Kit d'extraction d'acides nucléiques (AN) pour une utilisation avec les tests MAST ISOPLEX ou autres méthodes d'amplification.

### Utilisation pré

Le kit est destiné à l'extraction des AN des bactéries, des virus et des protozoaires.

L'échantillon peut être liquide, ou sur écouvillon, ou issu de boîtes de culture ainsi que de selles, d'urine ou de sang. Le kit est adapté au traitement automatique sur King Fisher Flex et sur d'autres systèmes de manipulation de liquide comme les systèmes Hamilton ; (contacter le Spécialiste de l'application correspondant).

### Remarque importante concernant l'utilisation de cette notice d'utilisation de la trousse

Toute modification de la notice d'utilisation (NU) du kit entraîne une modification du numéro de version au bas de la dernière page. Toutes les modifications apportées sont identifiées sur une feuille séparée ajoutée à la NU pour une période de trois mois à compter de la date de modification de la version.

S'assurer que la dernière version de la NU est utilisée pour la procédure d'analyse.

### Principe du test

Les méthodes à base de billes sont des méthodes simples et fiables pour l'extraction des acides nucléiques (AN). Tout d'abord, l'échantillon est lysé. Dans des conditions optimales, l'AN se lie sélectivement à la surface des billes magnétiques, tandis que les autres composants restent en solution. L'AN purifié peut être utilisé directement dans diverses applications de biologie moléculaire (séquençage, PCR, etc.). L'extraction peut être manuelle, semi-automatique ou entièrement automatisée.

### Contenu du kit

1. **LYSIS** Solution de lyse V  
1 x 250 mL
2. **PROT K** Protéinase K  
16 x 1,5 mL
3. **BINDING** Solution de liaison V  
1 x 650 mL
4. **MAG** MAG Suspension F  
10 x 1,1 mL
5. **WASH 1** Solution de lavage HS  
1 x 350 mL (volume définitif 700 mL)

6. **WASH 2** Solution de lavage LS  
2 x 130 mL (volume définitif 650 mL)
7. **WATER** Eau exempte de RNase  
4 x 30 mL
8. Notice d'utilisation

### Précautions d'emploi

1. Lire attentivement les instructions avant de procéder à l'essai. Ne pas modifier la procédure sans validation préalable.
2. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption.
3. Respecter les directives générales de santé et de sécurité au travail pour les matériaux potentiellement infectieux. Porter des vêtements de protection appropriés et utiliser les installations de laboratoire appropriées.
4. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots, car les réactifs ont été étalonnés pour chaque lot.
5. Ne pas contaminer les réactifs par contamination croisée ni les bouchons des flacons. Utiliser une pipette ou des embouts de pipette distincts pour chaque échantillon et réactif.
6. Les échantillons et les produits jetables contaminés doivent être éliminés conformément aux directives et règlements sur l'élimination des matières infectieuses. Pour la décontamination des surfaces, utiliser des désinfectants de surface appropriés. La verrerie contaminée doit être stérilisée à l'autoclave à 121 °C.
7. Si les flacons de tampon sont endommagés ou fuient, porter des gants et des lunettes de protection pour éliminer les flacons afin d'éviter toute blessure.
8. Les phrases de risque et de sécurité de la Communauté européenne pour les composants du kit d'extraction d'ADN / ARN MAST ISOPLEX® sont énumérées ci-dessous.

Solution de liaison V : contient du 2-propanol ; hautement inflammable, irritant (R11, 36, 67, 7, 16, S24/25/26)

Protéinase K : irritante, sensibilisante. Phrases de risque et de sécurité : R36/37/38-42 ; S22-24-24-26-37-37/38/38

Solution de lavage HS : contient du thiocyanate de guanidinium : nocif. Phrases de risque et de sécurité : R20/21/22-32 ; S13-26-36-46

Pour plus de détails, veuillez consulter la fiche de sécurité FDS.

### Conservation

#### Important

Conserver la **Protéinase K** lyophilisée entre 4°C et 8 °C.

Répartir la protéinase K dissoute non utilisée en aliquotes et la stocker à -20 °C.

Congélations et décongelations répétées réduisent considérablement l'activité.

La protéinase K lyophilisée peut être utilisée à partir de sa fabrication jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage, si elle est conservée entre 4°C et 8°C.

Conserver la suspension Mag F entre 4°C et 8°C, éviter de la congeler.

### Conditions de stockage

Tous les autres composants sont conservés à température ambiante.

### Composants non fournis

1. Tube exempt de RNase.
2. Ethanol à 96-99,8 %, non dénaturé ou méthylé.

### Premières étapes

1. Ajouter 350 mL d'éthanol à 96-99,8 % dans la solution de **lavage HS**, bien mélanger et garder le flacon toujours bien fermé.
2. Ajouter 520 mL d'éthanol à 96-99,8 % dans la solution de **lavage LS**, bien mélanger et garder le flacon toujours bien fermé.
3. Dissoudre la **protéinase K** en ajoutant 1,5 mL de ddH<sub>2</sub>O, bien mélanger et conserver comme décrit.

### Préparation de l'échantillon

#### Échantillons liquides / urine / sang :

Aucune préparation spécifique n'est nécessaire. Il peut être utilisé directement pour l'extraction.

#### Échantillons d'écouvillonnage :

##### • Test avec milieu liquide :

Le milieu liquide peut être utilisé directement pour l'extraction.

##### • Échantillons d'écouvillonnage sans milieu liquide :

Transférer les écouvillons dans des tubes contenant 1 mL solution saline physiologique (0,9 % NaCl) ou de PBS et incubé pendant 20 minutes, en agitant continuellement.

Presser et enlever l'écouvillon, puis 200 µL d'échantillon liquide peut être utilisé directement pour l'extraction.

#### Géloses :

- Choisissez quelques (3-5) colonies fraîches de nuit, remettre en suspension dans 200 µL de PBS pour une utilisation directe pour l'extraction.

#### Échantillons fécaux :

- Ajouter un échantillon de selles d'environ 50 à 100 mg dans un tube de réaction de 1,5 mL.
- Ajouter 250 µL de PBS (non fourni) et vortexer pendant 10 s
- Agiter à environ 16000 tr/min (environ 21000 x g) pendant 3 min
- 200 µL de surnageant peut être utilisé directement pour l'extraction.

### Échantillons de tissus :

- Pipeter 5 à 10 mg d'échantillon de tissu dans 400 µL d'eau bidistillée (sans RNase) ou de PBS et homogénéiser (homogénéisant tissulaire)
- Centrifuger l'homogénat pendant 2 min à 10000 g.
- 200 µL de surnageant peut être utilisé directement pour l'extraction.

Les échantillons préparés sont extraits sur le King Fisher Flex ou manuellement.

### KingFisher Flex : Extraction d'acides nucléiques

#### Étapes recommandées avant le démarrage

1. Assurez-vous que la solution de lavage HS, la Washing Solution LS et la Proteinase K ont été préparés selon l'instruction.
2. Mélanger la Suspension MAG F très bien en agitant au vortex pendant 1 minute.
3. Éviter le gel et le dégel des matériaux de départ.
4. Ajouter l'ADN/ARN de contrôle interne selon la NU du test d'amplification à la solution de lyse V.

#### Procédure d'extraction

1. Transférer 200 µL de Lysis Solution V (facultatif avec extraction / contrôle interne) dans la plaque à puits profonds (DW) étiquetée avec " Plaque de lyse «.
2. Ajouter 200 µL d'échantillon liquide (préparation de l'échantillon) dans la plaque DW contenant la solution V de lyse (facultatif avec extraction / contrôle interne).
3. Ajouter 20 µL de Proteinase K dans chaque puits utilisé.
4. Étiquetage et pré-rinsage des plaques à puits profonds.

Plaque	Étiquette	Contenu
Puits profond	Plaque de lyse	Échantillons lysés (y compris la solution de lyse V)
Puits profond	Plaque Lavage 1	500 µL Solution de lavage HS
Puits profond	Plaque Lavage 2	500 µL Solution de lavage LS
Puits profond	Plaque Lavage 3	500 µL Solution de lavage LS
Plaque 96 puits	Plaque d'élution	80 µL Eau sans RNase
Puits profond	Pointes de plaque	96 pointes de puits

5. Charger les plaques de puits profonds sur le KingFisher FlexTurn et sélectionner le protocole « Mast DNA\_RNAex » sur l'instrument KingFisher Flex et démarrer le test.
6. Suivre l'instruction et charger les plaques de puits profonds préremplies successives du plateau d'échantillons :

- Plaque peigne à pointe
- Plaque d'éluion
- Plaque de Lavage 3
- Plaque de Lavage 2
- Plaque de lavage 1
- Plaque de lyse (échantillon, solution de lyse V et protéinase K)

#### 7. Démarrage de l'extraction automatisée

- a) Le processus d'extraction automatisée commence par la lyse de l'échantillon. Après l'exemple de lyse, l'exécution automatisée s'arrête.
- b) Une fois l'appareil arrêté, retirer la « plaque de lyse » de l'appareil et ajouter 10 µL de suspension MAG F bien mélangée et 500 µL de solution de lyse V aux échantillons lysés.  
**REMARQUE :** Bien mélanger la solution MAG F en vortexant pendant 1 minute.
- c) Après l'ajout de la suspension MAG F et de la solution de lyse V, placer la « plaque de lyse » sur le King Fisher Flex et continuer le processus d'extraction en redémarrant le KingFisher Flex ('instruction sur l'écran du KingFisher Flex)

**REMARQUE IMPORTANTE** Après avoir terminé le protocole d'extraction, la plaque d'éluion contient l'ADN/ARN isolé. Conserver l'ADN/ARN dans des conditions adéquates. Nous vous recommandons de stocker l'ARN extrait à -80 °C.

9Si l'éluat contient des traces de particules magnétiques, placer la plaque sur un aimant ou centrifuger la plaque à vitesse maximale pendant 3 minutes. Pipeter le surnageant d'ADN /ARN dans une nouvelle plaque.

### Extraction manuelle des acides nucléiques

#### Étapes recommandées avant le démarrage

1. Vérifier que la solution de lavage HS, et les solutions de lavage LS et, Proteinase K ont été préparés selon l'instruction.
2. Mélanger très bien la suspension MAG F en agitant au vortex pendant 1 minute.
3. Éviter le gel et le dégel des matériaux de départ.
4. Facultatif : Chauffer à 60 °C
5. Ajouter l'ADN/ARN de contrôle interne selon la NU du test d'amplification à la solution de lyse V.

#### Processus d'extraction

1. Ajouter un échantillon de 200 µL et 200 µL de solution de lysis V dans un tube sans RNase (1,5 mL). Ajouter 20 µL de Protéinase K dans l'échantillon et bien mélanger en faisant monter et descendre.
2. Incuber l'échantillon à température ambiante pendant 15 min.  
**Remarque :** Mélanger l'échantillon plusieurs fois pendant l'incubation. Aucun mélange ne réduit l'efficacité de la lyse.
3. Ajouter **400 µL de Binding Solution V** et **10 µL de MAG Suspension F** dans le tube de réaction.

Mélanger l'échantillon en faisant monter et descendre plusieurs fois. Attendre 30 sec et mélanger à nouveau en faisant des pipetages de haut en bas plusieurs fois. Placer le tube de réaction dans un support magnétique. Attendre 20 sec et retirer soigneusement le liquide autant que possible.

**Note :** Ne pas enlever les billes magnétiques.

4. Retirer le tube de réaction de la grille magnétique et ajouter **500 µL de Washing Solution HS**. Bien mélanger en faisant des pipetages de haut en bas plusieurs fois jusqu'à ce que toutes les billes magnétiques soient bien dissoutes.

Placer le tube de réaction dans un support magnétique. Attendez 20 sec et retirer soigneusement le **liquide** autant que possible.

**Note :** Ne pas enlever les billes magnétiques.

5. Retirer le tube de réaction de la grille magnétique et ajouter **500 µL de Washing Solution LS**. Bien mélanger en faisant des pipes de haut en bas plusieurs fois jusqu'à ce que toutes les billes magnétiques soient bien dissoutes.

Placer le tube de réaction dans un support magnétique. Attendez 20 sec et retirer soigneusement le liquide autant que possible.

**Note :** Ne pas enlever les billes magnétiques.

6. Retirez le tube de réaction de la grille magnétique et ajouter **500 µL de Washing Solution LS**. Bien mélanger en faisant des pipetages de haut en bas plusieurs fois jusqu'à ce que toutes les billes magnétiques soient bien dissoutes.

Placer le tube de réaction dans un support magnétique. Attendez 20 sec et retirer soigneusement le liquide autant que possible.

**Note :** Ne pas enlever les billes magnétiques.

7. Retirer l'alcool résiduel du tube de réaction et aussi du couvercle autant que possible.

Sortir le tube de réaction de la grille magnétique et le sèche-cheveux avec couvercle ouvert à température ambiante jusqu'à ce que l'alcool soit complètement évaporé (environ 35 à 45 min) ou 10 à 15 min à 60 °C

**Note :** Ne pas enlever les billes magnétiques.

8. Remettre en suspension les billes magnétiques dans **de l'eau sans RNase de 80 µL** en faisant plusieurs fois monter et descendre. Attendez 1 min et remettre en suspension à nouveau la bille magnétique en faisant des pipetages de haut en bas.

Placer le tube dans la grille magnétique et attendre 20 secondes puis transférer l'échantillon liquide complètement dans le nouveau tube sans RNase.

**Note :** Éviter le transfert de billes magnétiques.

Les acides nucléiques extraits sont prêts à être utilisés pour l'application. Stocker à court terme les acides nucléiques extraits à +4 °C. Pour un stockage plus long un stockage à -20 °C est recommandé.

## Données de dosage

Spécifications du produit :

1. Matière première :  
Jusqu'à  $10^9$  cellules de bactéries Gram + ou Gram-
2. Durée de l'isolement : environ 60 minutes ou environ 45 minutes après l'étape de lyse
3. Capacité de liaison : > 50 µg NA.
4. Le rendement est suffisant pour les procédures d'amplification, jusqu'à 35 µg.

## Dépannage

Problème / Cause probable	Commentaires et suggestions
<b>Mauvaise lyse du produit de départ :</b>	
Rupture ou homogénéisation insuffisante	Après la lyse, centrifuger le lysat pour sédimenter les débris et continuer à utiliser le surnageant. Réduisez la quantité de produit de départ.
<b>Peu ou pas d'ARN total élué :</b>	
Rupture ou homogénéisation insuffisante	Réduire la quantité de produit de départ. La surcharge réduit le rendement !
<b>Contamination de l'ADN :</b>	
Trop de produit de départ	Réduisez la quantité de produit de départ.
Lyse incorrecte du produit de départ	Utilisez les techniques recommandées pour la lyse du culot cellulaire.
<b>ARN total dégradé :</b>	
Source d'ARN manipulée ou stockée de manière inappropriée	Assurez-vous que le produit de départ est frais ! Assurez-vous que le protocole, en particulier les premières étapes, a été exécuté rapidement.
Contamination des solutions par la RNase ; Tubes récepteurs, etc.	Utilisez des embouts filtrants stériles, sans RNase. Avant chaque préparation, nettoyez la pipette, les appareils et le lieu de travail. Toujours porter des gants !
<b>L'ARN total ne fonctionne pas bien dans les applications en aval :</b>	
Transfert de sel pendant l'éluion	Assurez-vous que la solution de lavage HS et la solution de lavage LS sont à température ambiante. Solution de lavage Checkup pour le sel précipité. S'il y a un précipité, dissolvez-les en chauffant soigneusement.

## **Änderungshistorie / Change History / Historique des changements**

Change history includes changes to significant aspects of the assay / IFU.

<b>Chapter</b>	<b>Description of change</b>
-	-

## **Notizen / Notes / Note:**



**Mast Diagnostica GmbH,**

Feldstraße 20,  
23858 Reinfeld,  
Deutschland

Tel: +49 (0)4533 2007 0  
Fax: +49 (0)4533 2007 68  
email: mast@mast-diagnostica.de  
Web: www.mast-group.com

**Mast Group Ltd.**

Mast House, Derby Road  
Bootle, Merseyside, L20 1EA  
United Kingdom

Tel: +44 (0)151 472 1444  
Fax: +44 (0)151 944 1332  
email: sales@mastgrp.com  
Web: www.mast-group.com

**Mast Diagnostic**

12 rue Jean-Jacques Mention  
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1  
France

Tél: +33 (3) 22 80 80 67  
Fax: +33 (3) 22 80 99 22  
email: info@mast-diagnostic.fr  
Web: www.mast-group.com

**Verwendete Symbole gemäß DIN EN ISO 15223-1**

**Icons are used according to DIN EN ISO 15223-1**

**Icônes utilisées selon DIN EN ISO 15223-1**