

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

MAST ISOPLEX® DNA / RNA Extraction Kit

REF 67DNAEX

50 Tests

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

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

	Deutsch	Seiten	02–04
	English	Pages	05–07
	Français	Pages	08–10

MAST ISOPLEX® DNA / RNA Extraction Kit

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

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.

Wichtiger Hinweis zur Gebrauchsinformation

Bei etwaigen Änderungen der Gebrauchsinformation 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 Gebrauchsinformation 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 15 mL
2. **PROT K** Proteinase K
für 1 x 1,5 mL
3. **BINDING** Bindungs-Puffer V
1 x 25 mL
4. **MAG** MAG Suspension F
1 x 1,1 mL
5. **WASH 1** Waschlösung HS
1 x 15 mL (Endvolumen 30 mL)
6. **WASH 2** Waschlösung LS
1 x 12 mL (Endvolumen 60 mL)
7. **WATER** RNase-freies Wasser
1 x 6 mL
8. **TUBE** RNase-freie Tubes (1,5 mL)
50 Stück
9. Gebrauchsinformation

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

1. Vor der Testdurchführung sorgfältig die Gebrauchsanweisung lesen. Die Testdurchführung nicht ohne Validierung modifizieren.
2. Keine Reagenzien nach dem Verfallsdatum 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 Sicherheitssätze 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!

Gelöste Proteinase K in Aliquots (200 µL) 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.

Lagerung

Alle anderen Komponenten bei Raumtemperatur lagern.

Zusätzlich benötigte Materialien

1. RNase-freie Tubes.
2. ddH₂O (doppelt destilliertes H₂O) zum Lösen der **Proteinase K**.
3. 96–99,8 % Ethanol, unvergällt oder methyliert.

Vor dem Start

1. Sicherstellen, dass die **Waschlösung HS**, die **Waschlösung LS** und die **Proteinase K** gemäß dieser Anleitung hergestellt wurden.
2. **MAG Suspension F** durch mehrfaches Invertieren des Röhrchens gut mischen.
3. Heizblock auf 60 °C vorheizen.

Erste Schritte

1. 15 mL 96–99,8 % Ethanol in die Flasche **Waschlösung HS** geben, gründlich mischen und Flasche immer fest verschlossen halten!
2. 48 mL 96–99,8 % Ethanol in die Flasche **Waschlösung LS** geben, gründlich mischen und Flasche immer fest verschlossen halten!
3. **Proteinase K** durch Zugabe von 1,5 mL ddH₂O lösen, gründlich mischen und wie beschrieben lagern!

Probenvorbereitung

Flüssige-, Urin- und Blutproben:

- Die Proben können direkt in Schritt 1 „Isolierung von Nukleinsäuren“ eingesetzt werden.

Abstrichproben:

• Testsysteme mit Flüssigmedien:

Das Flüssigmedium kann direkt in Schritt 1 „Isolierung von Nukleinsäuren“ eingesetzt 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 in Schritt 1 „Isolierung von Nukleinsäuren“ einsetzen.

Proben von Kulturplatten:

- 3–5 frische Kolonien einer Übernachtskultur in 200 µL PBS, suspendieren, anschließend mit Schritt 1 „Isolierung von Nukleinsäuren“ fortfahren.

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
- Mit 200 µL Überstand anschließend wie in Schritt 1 „Isolierung von Nukleinsäuren“ fortfahren.

Gewebeproben:

- Zu 5-10 mg Gewebeprobe 400 µL ddH₂O (RNase-frei) oder PBS pipettieren und homogenisieren (Gewebehomogenisator).
- Homogenat 2 min bei 10.000 x g zentrifugieren.
- Mit 200 µL Überstand anschließend wie in Schritt 1 „Isolierung von Nukleinsäuren“ fortfahren.

Isolierung von Nukleinsäuren

1. **200 µL Probe** 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.

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

Assay Daten

Produktspezifikationen:

1. Ausgangsmaterial:
Bis zu 1×10^9 Gram+ oder Gram- Bakterien.
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.

Troubleshooting

Problem / Ursache	Kommentare und Vorschläge
Unzureichende Lyse des Ausgangsmaterials:	
Unzureichende Disruption oder Homogenisation	Nach der Lyse zentrifugieren um Debris zu pelletieren. Den Überstand für das weitere Protokoll verwenden. Menge des Ausgangsmaterials reduzieren
Zu wenig oder keine RNA eluiert:	
Unzureichende Disruption oder Homogenisation	Menge des Ausgangsmaterials reduzieren, Überladung reduziert die Ausbeute
DNA Kontamination:	
Zu große Menge an Ausgangsmaterial	Menge des Ausgangsmaterials reduzieren
Unzureichende Lyse des Ausgangsmaterials	Vorgeschlagene Lysemethode für "Flüssigmedien" verwenden
Abbau der RNA:	
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!
Verschlechterung der RNA-Ausbeute bei Downstreamanwendung:	
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.

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.

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 15 mL
2. **PROT K** Proteinase K
for 1 x 1.5 mL, working solution
3. **BINDING** Binding Solution V
1 x 25 mL
4. **MAG** MAG Suspension F
1 x 1.1 mL
5. **WASH 1** Washing Solution HS
1 x 15 mL (final volume 30 mL)
6. **WASH 2** Washing Solution LS
1 x 12 mL (final volume 60 mL)
7. **WATER** RNase-free Water
1 x 6 mL
8. **TUBE** RNase free Tubes (1.5 mL)
50 pieces
9. 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 MSDS.

Stability and Storage

Important

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

Divide dissolved **Proteinase K** into aliquots (200 µL) 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.

Storage conditions

All other components are stored at room temperature.

Components not included in the kit

1. RNase free tubes.
2. ddH₂O (double distilled water) for dissolving **Proteinase K**.
3. 96–99.8 % ethanol, non-denatured or methylated.

Initial steps

1. Add 15 mL of 96-99.8 % ethanol to the bottle **Washing Solution HS**, mix thoroughly and keep the bottle always firmly closed!
2. Add 48 mL of 96-99.8 % ethanol to the bottle **Washing Solution LS**, mix thoroughly and keep the bottle always firmly closed!
3. Dissolve **Proteinase K** by addition of 1.5 mL of ddH₂O, mix thoroughly and store as described!

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 inverting the tube several times.
3. Preheat heating block to 60 °C.

Sample Preparation

Liquid / urine / blood samples:

No specific preparation is necessary. Start with step 1 "Isolation of Nucleic Acids".

Swab samples:

• Test systems with liquid media:

The liquid medium can be used directly in step 1 "Isolation of nucleic acids".

• 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 insert 200 µL of liquid sample in step 1 "Isolation of nucleic acids".

Agar plates:

- Pick a few (3–5) fresh overnight colonies, resuspend in 200 µL PBS and continue with step 1 "Isolation of Nucleic Acids".

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
- With 200 µL supernatant, continue as described in step 1 "Isolation of nucleic acids".

Tissue samples:

- Pipette to 5-10 mg tissue sample 400 µL ddH₂O (RNase-free) or PBS and homogenize (tissue homogenizer)
- Centrifuge the homogenate for 2 min at 10,000 x g.
- With 200 µL supernatant, continue as described in step 1 "Isolation of nucleic acids".

Isolation of Nucleic Acids

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.

Note: 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 1×10^9 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
Poor lysis of starting material:	
Insufficient disruption or homogenization	After lysis centrifuge lysate to pellet debris and continue with the protocol using the supernatant. Reduce amount of starting material.
Little or no total RNA eluted:	
Insufficient disruption or homogenization	Reduce amount of starting material. Overloading reduces yield!
DNA contamination:	
Too much starting material	Reduce amount of starting material.
Incorrect lysis of starting material	Use the recommended techniques for lysis of cell pellet.
Total RNA degraded:	
RNA source 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, etc.	Use sterile, RNase-free filter tips. Before every preparation clean up the pipette, the devices and the working place. Always wear gloves!
Total RNA does not perform well in downstream applications:	
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 (NA) pour une utilisation ultérieure dans les systèmes de test MAST ISOPLEX.

Utilisation pré

Le kit convient à l'extraction de bactéries, de virus et de protozoaires dans NA.

La matière première peut être liquide, des échantillons prélevés à l'aide d'écouvillons humains, des échantillons prélevés sur des plaques de culture ainsi que des échantillons de selles, d'urine ou de sang.

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

Toute modification du mode d'emploi (IFU) de la trousse entraînera une modification du numéro de version au bas de la dernière page. Toutes les modifications apportées seront identifiées sur une feuille séparée ajoutée à l'IFU pour une période de trois mois à compter de la date de modification de la version.

Veillez vous assurer que la dernière version de l'IFU est utilisée pour la procédure de dosage.

Principe du test

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

Contenu du kit

1. **LYSIS** Solution de lyse V
1 x 15 mL
2. **PROT K** Protéinase K
1 x 1,5 mL
3. **BINDING** Solution de liaison V
1 x 25 mL
4. **MAG** MAG Suspension F
1 x 1,1 mL
5. **WASH 1** Solution de lavage HS
1 x 15 mL (volume définitif 30 mL)
6. **WASH 2** Solution de lavage LS
1 x 12 mL (volume définitif 60 mL)
7. **WATER** Eau exempte de RNase
1 x 6 mL

8. **TUBE** Tubes exempte de RNase (1,5 mL)
50 pièces
9. **Mode d'emploi**

Warning and Precautions

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 pour le travail avec des matériaux potentiellement infectieux. Porter des vêtements de protection appropriés et utiliser les installations de laboratoire appropriées.
4. Ne pas mélanger les réactifs entre différents lots, car les réactifs ont été étalonnés pour chaque lot.
5. Ne pas contaminer les réactifs par contamination croisée ni les capsules d'échange sur les bouteilles. 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 bouteilles tampons sont endommagées ou fuient, portez des gants et des lunettes de protection lorsque vous jetez les bouteilles 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 MSDS.

Stabilité et stockage

Important

Conserver la Protéinase K lyophilisée à 4-8 °C!

Diviser la protéinase K dissoute en aliquotes (200 µL et conserver à - 20 °C). La congélation et la décongélation répétées réduiront considérablement l'activité!

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

Conditions de stockage

Tous les autres composants sont conservés à température ambiante.

Composants non inclus dans le kit

1. Tube exempt de RNase.
2. ddH₂O (eau doublement distillée) pour dissoudre la **Protéinase K**.
3. 96-99,8 % d'éthanol, non dénaturé ou méthylié.

Premières étapes

1. Ajouter 15 mL de 96-99,8 % d'éthanol à la solution de lavage HS, bien mélanger et garder la bouteille toujours bien fermée !
2. Ajouter 48 mL de 96-99,8 % d'éthanol à la solution de lavage LS, bien mélanger et garder la bouteille toujours bien fermée !
3. Dissoudre la protéinase K en ajoutant 1,5 mL de ddH₂O, bien mélanger et conserver comme décrit !

Étapes recommandées avant de commencer

1. Assurez-vous que la **solution de lavage HS**, la **solution de lavage LS** et la **protéinase K** ont été préparées conformément aux instructions.
2. Bien mélanger la **suspension F de MAG** en inversant plusieurs fois le tube.
3. Préchauffer le bloc de chauffage à 60 °C.

Préparation des échantillons

Échantillons de liquide / d'urine / de sang:

Aucune préparation spécifique n'est nécessaire. Commencez par l'étape 1 "Isolement des acides nucléiques".

Échantillons sur écouvillon:

- **Systèmes de test avec des milieux liquides:**
Le milieu liquide peut être utilisé directement à l'étape 1 "Isolement des acides nucléiques".
- **Échantillons sur écouvillon sans milieu liquide**
Transférer les écouvillons dans des tubes de solution saline physiologique de 1 mL (0,9% de NaCl) ou de PBS et incuber en agitant continuellement pendant 20 minutes.
Essorez et retirez le coton-tige, puis insérez 200 µL d'échantillon liquide à l'étape 1 "Isolement des acides nucléiques".

Plaques d'agar:

- Choisir 3-5 colonies fraîches d'une culture nocturne, remettre en suspension dans 200 µL de PBS et passer à l'étape 1 «Isolement des acides nucléiques».

Selles:

- Ajouter env. 50-100 mg d'échantillon de selles dans un tube à réaction de 1,5 mL.
- Ajouter 250 µL de PBS (non inclus dans le kit) et vortexer pendant 10 secondes

- Tourner à env. 16 000 tr/min (environ 21000 x g) pendant 3 min
- Continuer avec 200 µL de surnageant à l'étape 1 «Isolement des acides nucléiques».

Échantillons de tissus:

- Pipeter à 5-10 mg d'échantillon de tissu 400 µL de ddH₂O (sans RNase) ou de PBS et homogénéiser (homogénéisateur de tissu).
- Centrifuger l'homogénat pendant 2 min à 10000 x g.
- Avec 200 µL de surnageant, poursuivez comme décrit à l'étape 1 "Isolement des acides nucléiques".

Isolement des acides nucléiques

1. Ajouter **200 µL d'échantillon** et **200 µL de solution de lyse V** dans un **tube exempt de RNase de 1,5 mL**. Ajouter **20 µL de protéinase K** à l'échantillon et bien mélanger en pipetant.
2. Incuber l'échantillon à température ambiante pendant 15 min.

Remarque: Mélanger l'échantillon plusieurs fois pendant l'incubation. Aucun mélange ne réduira l'efficacité de la lyse.

3. Ajouter **400 µL de solution de liaison V** et **10 µL de Suspension F de MAG** dans le tube à réaction.

Mélanger l'échantillon en pipetant plusieurs fois. Attendez 30 secondes et mélangez à nouveau en pipetant plusieurs fois.

Placez le tube de réaction dans un support magnétique. Attendez 20 secondes et retirez soigneusement le liquide autant que possible.

Remarque: Ne retirez pas les billes magnétiques.

4. Sortez le tube de réaction du support magnétique et ajoutez **500 µL de solution de lavage HS**. Bien mélanger en pipetant plusieurs fois jusqu'à ce que toutes les billes magnétiques soient dissoutes.

Placez le tube de réaction dans un support magnétique. Attendez 20 secondes et retirez soigneusement le liquide autant que possible.

Remarque: Ne retirez pas les billes magnétiques.

5. Sortez le tube de réaction du support magnétique et ajoutez **500 µL de solution de lavage LS**. Bien mélanger en pipetant plusieurs fois jusqu'à ce que toutes les billes magnétiques soient dissoutes.

Placez le tube de réaction dans un support magnétique. Attendez 20 secondes et retirez soigneusement le liquide autant que possible.

Remarque: Ne retirez pas les billes magnétiques.

6. Sortez le tube de réaction du support magnétique et ajoutez **500 µL de solution de lavage LS**. Bien mélanger en pipetant plusieurs fois jusqu'à ce que toutes les billes magnétiques soient dissoutes.

Placez le tube de réaction dans un support magnétique. Attendez 20 secondes et retirez soigneusement le liquide autant que possible.

Remarque: Ne retirez pas les billes magnétiques.

Éliminer autant que possible l'alcool résiduel par pipetage du tube de réaction et du couvercle.

- Sortez le tube de réaction du support magnétique et laissez-le à ouvert à température ambiante jusqu'à évaporation complète de l'alcool (environ 35 à 45 min) ou 10-15 min à 60 °C.

Remarque: Ne retirez pas les billes magnétiques.

- Remettez les billes magnétiques en suspension dans **80 µL d'eau sans RNase** en pipetant plusieurs fois. Attendez 1 min et remettez en suspension la bille magnétique en pipetant de haut en bas.

Placez le tube dans le support magnétique et attendez 20 secondes, puis transférez l'échantillon de liquide dans le nouveau tube exempt de RNase.

Remarque: Évitez de pipeter les billes magnétiques.

Remarque: les acides nucléiques extraits sont prêts à être utilisés ultérieurement. Stocker à court terme les acides nucléiques extraits à +4 °C. Pour un stockage à long terme, -20 °C est recommandé.

Données de dosage

Spécifications du produit:

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

Dépannage

Problème / Cause probable	Commentaires et suggestions
Mauvaise lyse du produit de départ:	
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.
Peu ou pas d'ARN total élué:	
Rupture ou homogénéisation insuffisante	Réduire la quantité de produit de départ. La surcharge réduit le rendement!
Contamination de l'ADN:	
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.
ARN total dégradé:	
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!
L'ARN total ne fonctionne pas bien dans les applications en aval:	
Transfert de sel pendant l'élution	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.

**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