

Allemagne
MAST Diagnostica GmbH
Feldstraße 20
DE 23858 Reinfeld
Fon: +49 4533 2007 0
Fax: +49 4533 2007 68
www.mastgrp.com
mast@mast-diagnostica.de

Royaume Uni
MAST Group Ltd.
MAST House, Derby Road
Bootle, Merseyside, L20 1EA
Tel: +44 151 933 7277
Fax: +44 151 944 1332
www.mastgrp.com
sales@mastgrp.com

France
MAST Diagnostic
115 Rue Jules Barni CS91106
80011 Amiens CEDEX 1
Tél.: +33 3 22 80 80 67
Fax: +33 3 22 80 99 22
www.mastgrp.com
info@mast-diagnostic.fr



REF 67dnamp1 48 Tests
REF 67dnamp2 96 Tests
REF 67dnamp3 192 Tests

Utilisation

Mast Isoplex[®] DNA Amp: est un kit d'amplification isotherme d'ARN à partir d'un échantillon par inclusion d'un ensemble de primers de fabrication interne. Les réactifs Mast Isoplex[®] DNA Amp peuvent être utilisés pour le diagnostic in vitro IVD, si l'ensemble des primers sélectionnés par l'utilisateur est validé avec les éléments du kit Mast Isoplex[®] DNA Amp.

Composition

	48 Tests	96 Tests	192 Tests
Reaction Mix (RM) 2x conc.; bouchon jaune.	1x 1mL	2x 1 mL	3x 1 mL
Bst Polymerase Enzyme; (EM) bouchon blanc.	1x 55µL	1x 110 µL	1x 220 µL
Reverse Transcriptase (rEM); bouchon transparent	1x 28µL	1x 55 µL	1x 110 µL
Detection Dye (DD); bouchon bleu.	1x 55µL	1x 110 µL	1x 220 µL
Positive Control Primer Set (PM); bouchon rose.	1x 25µL	-	-
Positive Control (PC) ; bouchon rouge.	1x 40µL	-	-
Eau distillée(DW);bouchon transparent.	1x 1mL	1x 1 mL	2x 1 mL

Conservation

Avant ouverture, conserver le kit à -20°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Après ouverture, les réactifs se conservent à -20°C pendant 8 semaines. Eviter les congélations et décongélations répétées. Ne pas congeler et décongeler le colorant Fluorochrome Dye (FD) et le colorant de Détection Dye (DD) plus de quatre fois. Afin d'éviter ce problème, il est recommandé de stocker le colorant Fluorochrome Dye (FD) et le colorant de Détection Dye(DD) entre 2°C et 8°C. La date de péremption du kit est de un an.

Précautions d'emploi

Le kit Mast Isoplex[®] DNA Amp est à utiliser par du personnel qualifié avec l'ensemble des primers de fabrication interne. Les tubes utilisés pour la réaction doivent être maintenus fermés pendant toutes les étapes après l'ajout des réactifs. Les tubes usagés doivent être éliminés sans être ouverts après usage, selon la réglementation locale en vigueur.

Matériels nécessaires non fournis

- Echantillon d'ADN et ensembles de primers internes.
- Dispositifs standard sans DNase: tubes à réaction, pipettes et embouts.
- Instrument pouvant effectuer une incubation isotherme des tubes de la réaction à une température donnée tel que l'ESEQuant TS ou un thermocycleur. En cas d'utilisation du Fluorochrome Dye (FD), l'instrument doit être équipé d'un lecteur de fluorescence avec le réglage du FAM (thermocycleur en temps réel). La détection visuelle peut être effectuée en utilisant le colorant Detection Dye (DD).
- Le kit est compatible avec les turbidimètres Eiken LA320C et LA200.

Prélèvement

ARN des échantillons obtenus selon les procédures standardisées.

Procédure

En cas de série de plusieurs tests préparer la quantité suffisante de Master Mix en prévoyant une réaction de plus pour compenser les variations des volumes lors du pipetage.

Remarque: conserver les tubes de la réaction dans la glace ou dans un bloc isotherme froid pendant l'ajout des composants de la réaction. Les réactifs sortis du kit doivent être décongelés dans de la glace. Eviter les congélations et décongélations répétées. Bien mélanger les réactifs dans le tube pour réaction. Ne pas mélanger au vortex le mix avec l'enzyme. Vérifier que les tubes pour réaction ne soient pas cassés ou fissurés avant utilisation.

Pour une réaction:

- Déposer 12,5µL de Reaction Mix (RM) et 1µL de Fluorochrome Dye (FD) ou de Detection Dye (DD) dans un tube vierge stérile sans DNase/RNase.
- Mélanger doucement les composants en pipetant plusieurs fois les réactifs de bas en haut.
- Ajouter le volume utile de mix Primer (les volumes peuvent varier entre 1 µL et 2,5 µL). Pour le test de contrôle positif, ajouter 2µL de Positive Control Primer set (PM) (Option: si nécessaire, chauffer la solution de master mix à 95°C pendant 5 minutes; pour éliminer à cette étape tous les multimères de primer. Les primers fournis avec le kit pour le contrôle positif ne nécessitent pas cette étape optionnelle. Après chauffage, placer la solution Master Mix dans la glace pendant 5 minutes.)
- Déposer 1 µL de Bst Polymerase (EM) et 0,5 µL de Reverse transcriptase (rEM). **Attention:** ne pas agiter au vortex après l'ajout des enzymes.
- Ajouter de l'eau distillée (DW) en volume suffisant pour obtenir un volume final de 25 µL après dépôt de l'échantillon d'ARN. Mélanger les réactifs en pipetant plusieurs fois les réactifs de bas en haut.
- Ajouter 2,5 µL à 5µL d'échantillon d'ARN. Pour la réaction de contrôle positif, ajouter 5 µL de Positive Control (PC). Mélanger les réactifs en pipetant plusieurs fois les réactifs de bas en haut. (ne pas mélanger au vortex). Centrifuger les tubes.
- Placer les tubes dans l'incubateur approprié et démarrer la réaction. La température de la réaction qui dépend de l'ensemble de primers est de 60°C à 65°C. La durée de réaction est de 30 minutes à 60 minutes.

Remarque: si le Fluorochrome Dye est utilisé, le temps de réaction est plus court que celui pour le réactif de détection visuelle.

Interprétation des résultats

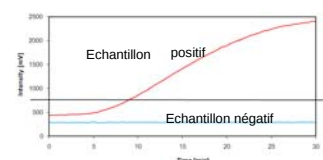
Fluorochrome Dye (FD) Un résultat positif est indiqué par la présence d'un courbe d'amplification. Un résultat négatif est indiqué par l'absence de fluorescence.

Exemple: Résultats ESEQuant TS

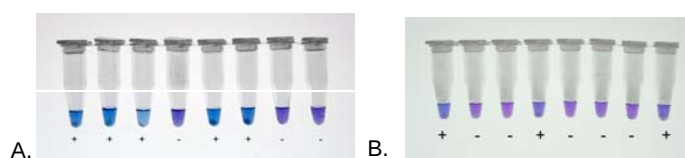
Rouge: échantillon positif

Bleu: échantillon négatif

Reproduction du manuel
ESEQuant TS Tube Scanner



Detection Dye (DD): en fonction de l'origine de l'ARN, l'échantillon varie en teinte et intensité. Un résultat positif donne une réaction colorée bleuâtre et un résultat négatif donne une coloration violette à bleuâtre. Remarque: les photos suivantes montrent des résultats positifs et négatifs.



Limites d'utilisation

Ces produits sont à utiliser pour l'amplification d'échantillon d'ARN à l'aide d'ensemble de primers spécifiques de fabrication interne ou de l'ensemble de primers Mast Isoplex® primer sets.

Contrôle de Qualité

Il est recommandé d'utiliser le contrôle positif (PC) du kit pour effectuer le contrôle de qualité d'une série de tests. Il est également recommandé, d'utiliser de l'eau distillée sans DNase/RNase free comme contrôle négatif dans chaque série de tests. Ces tests permettent de vérifier le bon fonctionnement des réactifs selon les spécifications ainsi que de l'absence de contamination des réactifs du kit. Ne pas utiliser le kit si les réactions de contrôles du kits ne sont pas correctes. Vérifier l'absence de tous signes de dégradation ou de contamination des réactifs du kit avant utilisation.

Références

¹Notomi T *et al.* Nucleic Acids Research (2000) **28** 12, 63