

Préparation de la gamme d'étalonnage

❖ **Gamme de 5 niveaux : 250 000 à 25 UG** (par dilution en série au 10^{ème})

6. Déposer 180 µL de diluant dans un nouveau tube.
7. Homogénéiser le contenu du tube d'étalon primaire réhydraté pendant 5 s.
8. Prélever 20 µL d'ADN réhydraté et les dispenser dans le tube 2.
9. Homogénéiser le tube N°2 avec l'agitateur pendant 5 secondes.
10. Répéter l'opération pour passer du tube 2 à 3, puis 3 à 4, etc.

❖ **Gamme de 4 niveaux : 45 000 – 4500 – 450 – 15 UG** (à partir d'un ADN reconstitué à 225 000 UG/puits)

6. Déposer 80 µL de diluant dans un nouveau tube.
7. Homogénéiser le contenu du tube d'étalon primaire réhydraté pendant 5 s.
8. Prélever 20 µL d'ADN réhydraté et les dispenser dans le tube 1 (45 000 UG).
9. Homogénéiser le tube 1 pendant 5 s.
10. Prélever 20 µL du tube 1 et les dispenser dans 180 µL de diluant (tube 2).
11. Répéter l'opération pour passer du tube 2 à 3.
12. Prélever 20 µL du tube 3 et les dispenser dans 580 µL de diluant (tube 4).

Etalon primaire
ADN de *Legionella pneumophila*
Notice d'utilisation (V3 mars 2023)

Référence : SRM_LEGDNA_01



La gamme d'ADN ainsi obtenue est stable à 5°C ± 3°C pendant 72 heures.

Conservation

L'ADN étalon et le diluant doivent être conservés à **-20°C**. Ils peuvent être conservés dans ces conditions jusqu'à la date de fin de validité du certificat.

Matériels et consommables nécessaires

- Microtubes stériles et « nuclease free »
- Micropipettes
- Pointes à filtres stériles et « nuclease free » adaptées aux micropipettes
- Mini centrifugeuse de paillasse
- Agitateur de paillasse

Important

- ✓ L'ADN déshydraté doit être remis en solution **avec le diluant fourni**.
- ✓ L'étalon primaire d'ADN de *Legionella pneumophila* doit être utilisé par un personnel respectant les **Bonnes Pratiques de Laboratoire** et utilisant du **matériel de laboratoire étalonné**.
- ✓ Changer de cône à filtre à chaque pipetage pour éviter de générer des biais lors de l'étalonnage.
- ✓ Ne pas mouiller le cône avant de prélever : Plonger la pointe du cône sec dans le haut du liquide, prélever puis dispenser en éjectant la totalité du volume contre la paroi du tube.

Mode opératoire

1. Décongeler un tube de diluant à température ambiante. Homogénéiser le diluant en le vortexant pendant 5 secondes. Centrifuger brièvement le tube.
2. Sortir un tube d'ADN déshydraté du congélateur. Centrifuger le tube 10 secondes.
3. Selon la concentration souhaitée et le volume d'échantillon utilisé par la méthode d'amplification, on détermine le volume de diluant à ajouter pour réhydrater l'ADN.

$$V \text{ diluant} = [(1.06e7 \text{ (UG/tube)} / 2 * C_{\text{ADN}} \text{ souhaitée (UG/puits)})] \times V \text{ échantillon (}\mu\text{L/puits)}$$

- pour obtenir une solution à **225 000 UG / puits de 5 μ L d'échantillon**, il faut ajouter :

$$\text{Volume de diluant} = [(1.06e7 \text{ (UG/tube)} / 2 * 2.25e5 \text{ (UG/puits)})] \times 5 \text{ (}\mu\text{L/puits)} = \text{118 } \mu\text{L}$$

- pour obtenir une solution à **250 000 UG / puits de 6 μ L d'échantillon**, il faut ajouter :

$$\text{Volume de diluant} = [(1.06e7 \text{ (UG/tube)} / 2 * 2.5e5 \text{ (UG/puits)})] \times 6 \text{ (}\mu\text{L/puits)} = \text{127,5 } \mu\text{L}$$

4. Ajouter dans le tube d'ADN le volume de diluant calculé précédemment.
5. Laisser reposer à $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ pendant $1\text{h} \pm 5\text{min}$ **sans homogénéiser** pour remettre l'ADN en solution.