

User Manual

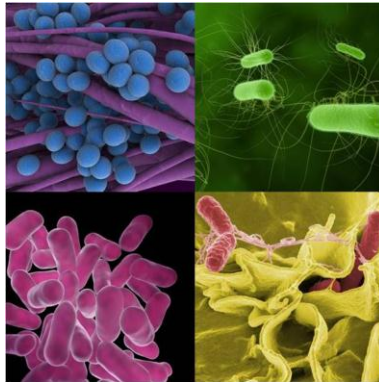
SureFast[®] PREP Bacteria

Art. No. F1021

100 extractions

Efficient DNA preparation of bacteria

May 2017



CONGEN 

Inhaltsverzeichnis



Prinzip..... 3
Kit-Inhalt (je Box) und Lagerung 3
Zusätzlich benötigte Geräte und Materialien 3
Vorbereitungen 4
 Allgemein 4
 Vor jeder Präparation 4
Extraktionsprotokoll 4
Weitere Informationen 5
Technischer Support..... 5
Gefahrenhinweise 6

Table of contents



Description 7
Principle 7
Kit components (per box) and storage 7
Additionally required equipment and materials 7
Preparations 8
 General 8
 Before each preparation 8
Extraction protocol 8
Product Information 9
Technical Support 9
Safety information.....10

Beschreibung

Dieses Kit dient der Extraktion von Bakterien - DNA aus Lebensmitteln (Anreicherungen, Abschwemmungen oder Abstrichen).

In Proben mit geringer mikrobiologischer Aktivität (z.B. hitzebehandeltes Eiweißpulver) können auch nicht lebensfähige Bakterien nachgewiesen werden. Diese Zellen würden unter anderen Bedingungen von der Begleitflora metabolisiert werden.

Um das Wachstumspotenzial des Bakteriums besser beurteilen zu können, wird empfohlen, die Proben zu Beginn und am Ende der kulturellen Anreicherung zu analysieren.

Prinzip

1. Vorbereitung des Ausgangsmaterials
2. Lyse bei 99°C
3. Einstellen optimaler Bindungsbedingungen
4. Bindung der Nucleinsäuren an einen Spin Filter
5. Aufreinigung der gebundenen Nucleinsäuren
6. Trocknen des Spin Filters
7. Elution der Nucleinsäuren vom Spin Filter

Kit-Inhalt (je Box) und Lagerung

1x Lysis Buffer (20 ml)	(Code L)	1x Receiver Tubes 2,0 ml, klar (50 x)	(Code R)
1x Binding Buffer (10 ml)	(Code B)	1x Receiver Tubes 1,5 mL, klar (50 x)	(Code T)
1x Wash Buffer (60 ml)*	(Code W)	1x Spin Filter, klar (50 x)	(Code S)
1x Elution Buffer (10 ml)	(Code E)		

* Nach Zugabe von mindestens 96%igem Ethanol (nicht im Kit enthalten).

Die Bestandteile des Kits sollten bei Raumtemperatur (14-25°C) gelagert werden.

Zusätzlich benötigte Geräte und Materialien

- geeignete Geräte für die Probenzerkleinerung und -homogenisierung
- Analysenwaage und Spatel/Löffel zum Einwiegen der Proben
- DNA- und DNase-freie Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2,0 ml
- wasserfester Stift und Etiketten zum Beschriften der Reaktionsgefäße
- puderfreie Einmalhandschuhe
- Pipetten und Pipettenspitzen mit Filtern
- Vortexmischer
- Thermomixer/Heizblock (bis 99°C)
- Mikrozentrifuge (bis 12.000 rpm)
- Ethanol (Reinheit $\geq 96\%$) zum Auffüllen des Wash Buffer
- Abwurfbeutel oder ähnliches Abfallbehältnis
- Autoklav
- Sicherheitswerkbank

Vorbereitungen**Allgemein**

- Auffüllen des Wash Buffers (**Code W**) durch Zugabe von 42 ml Ethanol und mischen.

Vor jeder Präparation

- Vorwärmen des Elution Buffers (**Code E**) - Überführen der benötigten Menge unter Einrechnung einer Reservemenge an Elution Buffer in ein Reaktionsgefäß (nicht im Kit enthalten). Inkubation bei 60°C (der Elution Buffer wird in Schritt 7 benötigt).

Extraktionsprotokoll**1. Vorbereitung des Ausgangsmaterials**

Unter sterilen Bedingungen 1,0 ml einer Anreicherung oder Abschwemmung entnehmen und in ein 1,5 ml Reaction Tube (nicht im Kit enthalten) überführen.

Zentrifugation für 5 min bei 12.000 rpm.

Flüssigen Überstand vorsichtig abpipettieren und z.B. durch Autoklavieren inaktivieren.

Bei Abstrichen (Tupfer), diese in ein 1,5 ml Reaction Tube (nicht im Kit enthalten) überführen und den Schaft abschneiden, damit der Deckel des Tubes geschlossen werden kann.

2. Lyse des Ausgangsmaterials

Zugabe von 400 µl Lysis Buffer (**Code L**) zu der Probe. Im Anschluss die Probe gut vermischen und die Reaktionsgefäße mit einer Klammer verschließen.

Inkubation bei 99°C für 10 min unter kontinuierlichem Schütteln.

3. Einstellen optimaler Bindungsbedingungen

Zentrifugation des Lysates für 1 min bei 12.000 rpm.

Überführen von ca. 300 µl des flüssigen Überstands (Lysat) in ein neues 1,5 ml Reaction Tube (nicht im Kit enthalten).

Hinweis: In Abhängigkeit von den Matrixeigenschaften kann das Volumen nach der Zentrifugation geringer ausfallen. In diesem Fall das erhaltene Volumen einsetzen oder das Volumen des Lysis Buffer vor der Lyse erhöhen.

4. Bindung der Nucleinsäuren an einen Spin Filter

200 µl des Binding Buffers (**Code B**) zu dem Lysat geben und gut vermischen.

Einen Spin Filter (**Code S**) in ein 2,0 ml Receiver Tube (**Code R**) setzen.

Das Probenextrakt auf den Filter geben und für 1 min bei Raumtemperatur inkubieren.

Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm.

Filtrat verwerfen und den Spin Filter wieder in das Receiver Tube einsetzen.

5. Aufreinigung der gebundenen Nucleinsäuren

550 µl Wash Buffer (**Code W**) auf den Spin Filter geben. Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm. Filtrat verwerfen und den Spin Filter wieder in das Receiver Tube einsetzen.

Erneut 550 µl Wash Buffer (**Code W**) auf den Spin Filter geben. Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm. Filtrat verwerfen und den Spin Filter wieder in das Receiver Tube einsetzen.

6. Trocknen des Spin Filters

Zentrifugation für 2 min bei 12.000 rpm, um Ethanolreste von dem Spin Filter zu entfernen.

7. Elution der Nucleinsäuren vom Spin Filter

Den Spin Filter in ein 1,5 ml Receiver Tube (**Code T**) setzen. Zugabe von 100 µl des erwärmten Elution Buffers (**Code E**).

Inkubation für 3 min bei Raumtemperatur. Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm. Den Spin Filter anschließend verwerfen.

Die eluierten Nucleinsäuren können direkt in die PCR eingesetzt oder bis zu 24 Stunden bei 4°C gelagert werden. Bei längerer Lagerung sollten die Nucleinsäuren bei -20°C aufbewahrt werden.

Weitere Informationen

- Material Safety Data Sheet
- Fließschema
(Download: <http://www.congen.de/unternehmen/download>)

Technischer Support

Fragen zur Durchführung bitte per E-Mail an info@congen.de.

Gefahrenhinweise

Binding Buffer



Gefahr

Lysis Buffer



Achtung

H225 H319 H336
P210 P233 P305+P351+P338

H319 H412
P280 P305+P351+P338

- H225:** Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H319: Verursacht schwere Augenreizung.
H336: Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
P210: Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.
P233: Behälter dicht verschlossen halten.
P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.

Für weitere Informationen stellen wir auf Anfrage ein Sicherheitsdatenblatt zur Verfügung. Bitte wenden Sie sich an Ihren Distributor oder per E-Mail an info@congen.de.

Description

The kit is intended to be used for the isolation of bacteria - DNA from food (enrichments, avulsions and swabs).

In samples with a very low microbial activity (e.g heat pasteurized egg white powder) a contamination with not viable or not culturable bacteria cells might be observed. In case of other conditions the samples show a fast metabolization of these cells. To assess the process of bacterial growth, it is recommended to compare the samples at the beginning and at the end of the culturing

Principle

1. Preparation of the basic material
2. Lysis at 99°C
3. Setting of optimal binding conditions
4. Binding of the nucleic acids on a Spin Filter
5. Purification of the bound nucleic acids
6. Drying of the Spin Filter
7. Elution of nucleic acids from the Spin Filter

Kit components (per box) and storage

1x Lysis Buffer (20 ml)	(Code L)	1x Receiver Tubes 2.0 ml, clear (50x)	(Code R)
1x Binding Buffer (10 ml)	(Code B)	1x Receiver Tubes 1.5 ml, clear (50x)	(Code T)
1x Wash Buffer (60 ml)*	(Code W)	1x Spin Filter, clear (50x)	(Code S)
1x Elution Buffer (10 ml)	(Code E)		

* After adding ethanol (purity \geq 96 %; not supplied with the kit).

All reagents of the kit should be stored dry and at room temperature (14-25°C).

Additionally required equipment and materials

- suitable equipment for sample comminution and homogenization
- micro balance and spatula for weighing the samples
- reaction tubes free from DNA and DNase 1.5 ml; 2.0 ml
- waterproof pen and tags for labeling the reaction tubes
- unpowdered disposable gloves
- pipettes with filter tips
- Vortex mixer
- Thermomixer/ heating block (up to 99°C)
- micro centrifuge (up to 12,000 rpm)
- ethanol (purity \geq 96 %) for preparation of Pre-Wash Buffer and Wash Buffer
- disposal bags or waste bin
- autoclave
- biological safety cabinet

Preparations**General**

- Add 42 ml ethanol to the Wash Buffer (**Code W**) and mix thoroughly.

Before each preparation

- Preheating the Elution Buffer (**Code E**) - Transfer the needed amount of Elution Buffer (**Code E**) under calculation of a reserve volume into a reaction tube (not supplied with the kit) and equilibrate to 60°C (The Elution Buffer is necessary for step 7).

Extraction protocol**1. Preparation of the basic material**

Transfer 1.0 ml of the enrichment or avulsions under sterile conditions into a 1.5 ml reaction tube (not provided with the kit).

Centrifuge for 5 min at 12.000 rpm.

Discard the fluid and inactivate per sterilization.

For swabs, place them into a 1.5 ml reaction tube (not provided with the kit) and cut the shaft, so that you can close the cap of the extraction tube.

2. Lysis of the basic material

Add 400 µl of Lysis Buffer (**Code L**), mix it briefly and close the reaction tube with caps.

Incubate under continuously shaking for 10 minutes at 99°C.

3. Setting of optimal binding conditions

Centrifuge the sample lysate for 1 min at 12.000 rpm.

Transfer ca. 300 µl of the liquid supernatant into a new 1.5 ml reaction tube (not supplied with the kit).

Note: Depending on the nature of the sample a smaller amount of liquid may be obtained after centrifugation.

In this case take the actual volume for the following steps or vary the volume of the Lysis Buffer before lysis.

4. Binding of the nucleic acids on a Spin Filter

Add 200 µl Binding Buffer (**Code B**) to the filtrate and mix the sample.

Place a Spin Filter (**Code S**) into a 2.0 ml Receiver Tube (**Code R**).

Transfer the solution directly onto the filter and incubate at room temperature for 1 min.

Centrifuge for 1 min at 12.000 rpm.

Discard the filtrate and place the Spin Filter back into the Receiver Tube.

5. Purification of the bound nucleic acids

Add 550 µl Wash Buffer (**Code W**) to the Spin Filter and centrifuge for 1 min at 12.000 rpm. Discard the filtrate and place the Spin Filter back into the Receiver Tube.

Add again 550 µl Wash Buffer (**Code W**) to the Spin Filter and centrifuge for 1 min at 12.000 rpm. Discard the filtrate and place the Spin Filter back into the Receiver Tube.

6. Drying of the Spin Filter

Remove the residual Ethanol by centrifugation for 2 min at 12.000 rpm.

7. Elution of nucleic acids from the Spin Filter

Place the Spin Filter into a 1.5 ml Receiver Tube (**Code T**) and add 100 µl of the preheated Elution Buffer (**Code E**) directly onto the Spin Filter.

Incubate for 3 min at room temperature and centrifuge for 1 min at 10.000 rpm. After centrifugation discard the Spin Filter.

The eluted DNA is ready-to-use for the PCR. The DNA can be stored for up to 24 hours at 4°C. For a storage time of more than 24 hours it should be kept at -20°C.

Product Information

- Material Safety Data Sheet
- Flow chart
(Download: <http://www.congen.de/en/company/download>)

Technical Support

For further questions please send an e-mail to info@congen.de.

Safety information

Binding Buffer



Danger

Lysis Buffer



Warning

H225 H319 H336
P210 P233 P305+P351+P338

H319 H412
P280 P305+P351+P338

- H225:** Highly flammable liquid and vapour.
H319: Causes serious eye irritation.
H336: May cause drowsiness or dizziness.
H412: Harmful to aquatic life with long lasting effects.
P210: Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking.
P233: Keep container tightly closed.
P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
P305+P351+P338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

For further information we offer a Material Safety Data Sheet. Please contact your distributor or send an e-mail to info@congen.de.