

User Manual

SureFast[®] PREP Aqua

Art. No. F1023

100 extractions

Efficient DNA preparation of bacteria DNA from water samples

Version 3.4 - 2016/03



CONGEN 

Inhaltsverzeichnis

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

Table of contents

Description.....	6
Principle.....	6
Kit components (per box) and storage	6
Additionally required equipment and materials	6
Preparations.....	6
Extraction protocol	7
Product Information.....	7
Technical Support.....	8
Safety information	8

Beschreibung

Dieses Kit dient der Extraktion von bakterieller DNA aus Wasserproben.

Prinzip

1. Membranfiltration
2. Thermische Lyse der Bakterienzellen
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

50x Membrane Filter (weiß mit Gitternetz; Porengr. 0,45µm) ¹⁾	(Code F)	1x Elution Buffer (10 ml)	(Code E)
		1x Receiver Tubes 2,0 ml (50x)	(Code R)
1x Lysis Buffer A (50 ml)	(Code L)	1x Receiver Tubes 1,5 ml (50x)	(Code T)
1x Binding Buffer (10 ml)	(Code B)	1x Spin Filter (50x)	(Code S)
1x Wash Buffer (60 ml) ²⁾	(Code W)		

¹⁾ Die im Kit enthaltene Membran besteht aus Cellulosemischester. Anstatt der im Kit enthaltenen Membran Filter können für die Extraktion von *Legionella* spp. auch Polycarbonat-Membran Filter gemäß der ISO/TS 12869 verwendet werden.

²⁾ 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

- Membranfilteranlage
- DNA- und DNase-freie Reaktionsgefäße 1,5 ml
- wasserfester Stift und Etiketten zum Beschriften der Reaktionsgefäße
- puderfreie Einmalhandschuhe
- Pipetten und Pipettenspitzen mit Filtern
- sterile Pinzetten und Spatel
- Vortexmischer
- Thermomixer/Heizblock (bis 95°C)
- Mikrozentrifuge (bis 12.000 rpm)
- Ethanol (Reinheit ≥ 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**

500 ml (0,1 – 1 Liter je nach Verschmutzungsgrad) der Probelösung unter Verwendung eines Membran Filter (**Code F**) filtrieren. Dabei den Filter (weiß mit Gitternetz) mit dem Gitternetz nach oben auf den Filterhalter legen.

Achtung: Wird das SureFast® PREP Aqua Kit zusammen mit dem SureFast® Legionella Screen PLUS real time PCR Kit zum Nachweis von *Legionella* spp. und der Auswertung über den Grenzwert von 100 CFU/100 ml (Positive Control) aus der Trinkwasserverordnung - TrinkwV 2001 verwendet, müssen 100 ml der Probelösung filtriert werden.

Den Filter anschließend mit einer sterilen Pinzette zusammenfalten (ggf. unter Zuhilfenahme eines sterilen Spatels o. ä., da der Filter mehrmals gefaltet werden muss) und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (nicht im Kit enthalten) überführen.

2. Thermische Lyse

Zugabe von 1,0 ml Lysis Buffer A (**Code L**) zu dem Filter. Kurz vortexen, damit der gesamte Filter vom Lysis Buffer umspült wird. Das Reaktionsgefäß mit einer Klammer verschließen. Inkubation der Lösung bei 95°C für 10 min unter kontinuierlichem Schütteln.

3. Einstellen optimaler Bindungsbedingungen

Überführen von 130 µl Lysat in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (nicht im Kit enthalten). 200 µl Binding Buffer (**Code B**) zugeben.

4. Bindung der Nucleinsäuren an einen Spin Filter

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

Die Probelösung gut vermischen, auf den Spin Filter geben und für 1 min bei Raumtemperatur inkubieren. Im Anschluss bei 12.000 rpm für 1 min zentrifugieren. Das Filtrat verwerfen und den Spin Filter wieder in das Tube einsetzen.

5. Aufreinigung der gebundenen Nucleinsäuren

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

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

6. Trocknen des Spin Filters

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

7. Elution der Nucleinsäuren vom Spin Filter

Den Spin Filter in ein klares 1,5 ml Receiver Tube (**Code T**) setzen und 50 µl des erwärmten Elution Buffer (**Code E**) zugeben.

Inkubation für 3 min bei Raumtemperatur. Zentrifugation bei 10.000 rpm für 1 min. 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

Technischer Support

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

Gefahrenhinweise

Binding Buffer



Gefahr

H225-319-336 P210-233-305-351-338

- H225:** Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H319: Verursacht schwere Augenreizung.
H336: Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
P210: Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.
P233: Behälter dicht verschlossen halten.
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

This kit is intended to be used for the isolation of bacteria DNA from water samples.

Principle

1. Membrane filtration
2. Lysis of bacterial cells
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

50x Membrane Filter (white with grid; pore size 0.45 µm) ¹⁾	(Code F)	1x Elution Buffer (10 ml)	(Code E)
		1x Receiver Tubes 2.0 ml (50x)	(Code R)
1x Lysis Buffer A (50 ml)	(Code L)	1x Receiver Tubes 1.5 ml (50x)	(Code T)
1x Binding Buffer (10 ml)	(Code B)	1x Spin Filter (50x)	(Code S)
1x Wash Buffer (60 ml) ²⁾	(Code W)		

¹⁾ The membrane included in the kit is made of mixed cellulose esters. As an alternative of the membrane filter (included in the kit) polycarbonate membrane filter can be used for the detection of *Legionella* spp. according to ISO/TS 12869.

²⁾ After adding ethanol (purity ≥ 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

- membrane filtering system
- reaction tubes free from DNA and DNase 1.5 ml
- waterproof pen and tags for labeling the reaction tubes
- unpowdered disposable gloves
- pipettes with filter tips
- sterile tweezers and spatula
- Vortex mixer
- Thermomixer/ heating block (up to 95°C)
- micro centrifuge (up to 12,000 rpm)
- ethanol (purity ≥ 96 %) for preparation of 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**

Filtrate 500 ml (0.1 – 1.0 l depending on the degree of contamination) of the water sample using the Membrane Filter (**Code F**). Place the filter (white with grid) with the grid showing upwards onto the filter holder.

Note: If the SureFast® PREP Aqua kit is used together with the SureFast® Legionella Screen PLUS real time PCR kit for the detection of *Legionella* spp. in combination with the German drinking water ordinance 2001 limit of 100 CFU/100 ml (Positive Control), 100 ml of the sample have to be filtered.

Fold the filter with a sterile tweezer (because the filter needs to be folded more than once, a sterile spatula to fix the filter might be helpful) and transfer it into a 1.5 ml reaction tube (not supplied with the kit).

2. Thermal lysis

Add 1.0 ml Lysis Buffer (**Code L**) to the filter, mix briefly to ensure that the whole filter is completely surrounded by Lysis Buffer. Close the reaction tube with a cap and incubate under continuously shaking for 10 min at 95°C.

3. Setting of optimal binding conditions

Transfer 130 µl of the lysate into a 1.5 ml reaction tube (not supplied with the kit) and add 200 µl Binding Buffer (**Code B**).

4. Binding of the nucleic acids on a Spin Filter

Place a Spin Filter (**Code S**) into a yellow 2.0 ml Receiver Tube (**Code R**). Mix the sample solution, transfer it 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 yellow 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 yellow Receiver Tube.

Once more 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 yellow Receiver Tube.

6. Drying of the Spin Filter

Remove the residual ethanol by final centrifugation for 2 min at 12,000 rpm.

7. Elution of nucleic acids from the Spin Filter

Place the Spin Filter into a clear 1.5 ml Receiver Tube (**Code T**) and add 50 µl of the preheated Elution Buffer (**Code E**) directly onto the Spin Filter.

Incubate 3 min at room temperature and centrifuge for 1 min at 10,000 rpm. After centrifugation discard the Spin Filter.

The eluted nucleic acids are 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

Technical Support

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

Safety information

Binding Buffer



Danger

H225-319-336 P210-233-305-351-338

- H225:** Highly flammable liquid and vapour.
H319: Causes serious eye irritation.
H336: May cause drowsiness or dizziness.
P210: Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking.
P233: Keep container tightly closed.
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.