

CONGEN

SureFast[®] PREP Aqua

Art. No. F1023
100 extractions

User Manual

Efficient DNA preparation of bacteria DNA from water samples



October 2024

**Inhalt**

1	Allgemeines	4
1.1	Beschreibung	4
1.2	Kit-Inhalt und Lagerung	4
1.3	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	4
2	Protokoll	5
2.1	Prinzip	5
2.2	Vorbereitungen	5
	Allgemein	5
	Vor jeder Präparation	5
2.3	Extraktionsprotokoll	5
	1. Vorbereitung des Ausgangsmaterials	5
	2. Lyse des Ausgangsmaterials	5
	3. Einstellung optimaler Bindungsbedingungen	6
	4. Bindung der Nucleinsäuren an einen Spin Filter	6
	5. Aufreinigung der gebundenen Nucleinsäuren	6
	6. Trocknen des Spin Filters	6
	7. Elution der Nucleinsäuren vom Spin Filter	6
3	Weitere Informationen	7
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	7
3.2	Technischer Support	7

**Content**

1	General Information	8
1.1	Description	8
1.2	Kit components and storage	8
1.3	Additionally required equipment and materials	8
2	Protocol	9
2.1	Principle	9
2.2	Preparations	9
	General	9
	Before each preparation	9
2.3	Extraction protocol	9
	1. Preparation of the basic material	9
	2. Lysis of the basic material	9
	3. Setting of optimal binding conditions	10
	4. Binding of the nucleic acids on a Spin Filter	10
	5. Purification of the bound nucleic acids	10
	6. Drying of the Spin Filter	10
	7. Elution of nucleic acids from the Spin Filter	10
3	Further Information	11
3.1	Product Information	11
3.2	Technical Support	11

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

Dieses Kit dient der Extraktion von Bakterien-DNA aus Wasserproben.

1.2 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz/Material	Menge (je Box)
F	Membrane Filter (weiß mit Gitternetz; Porengr. 0,45µm) ***	50 x
L	Lysis Buffer	1 x 50 ml
B	Binding Buffer*	1 x 4 ml
W	Wash Buffer**	1 x 18 ml
E	Elution Buffer	1 x 10 ml
S	Spin Filter	1 x 50 Filter
R	Receiver Tubes 2,0 ml	1 x 50 Tubes
T	Receiver Tubes 1,5 ml	1 x 50 Tubes

* Zugabe von Isopropanol (nicht im Kit enthalten, siehe 1.3 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien)

** Zugabe von Ethanol (nicht im Kit enthalten, siehe 1.3 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien)

*** 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.

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

1.3 Zusätzliche 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 zum Auffüllen des Wash Buffer (reinst, ≥ 96 %)
- Isopropanol zum Auffüllen des Binding Buffer, (z.B. Carl Roth 2-Propanol Rotipuran® >99,7%; Applichem 2-Propanol für Mikrobiologie; Sigma-Aldrich 2-Propanol)
- Abwurfbeutel oder ähnliches Abfallbehältnis
- Autoklav
- Sicherheitswerkbank

2 Protokoll

2.1 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

2.2 Vorbereitungen

Allgemein

Auffüllen des Binding Buffers (**Code B**) durch Zugabe von 11 ml Isopropanol und mischen.

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.

2.3 Extraktionsprotokoll

1. Vorbereitung des Ausgangsmaterials

500 ml (0,1 – 1 Liter je nach Verschmutzungsgrad) der Probelösung unter Verwendung eines Membran Filters (**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 2023 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. Lyse des Ausgangsmaterials

Zugabe von 1 ml Lysis Buffer (**Code L**) zu dem Filter. Im Anschluss die Probe auf einem Vortexmischer gut vermischen, so dass der gesamte Filter umspült ist. Anschließend die Reaktionsgefäße mit einer Klammer verschließen.

Inkubation bei 95°C für 10 min unter kontinuierlichem Schütteln im Thermomixer/Heizblock.

3. Einstellung optimaler Bindungsbedingungen

Überführen von 130 µl des Lysates in ein neues 1,5 ml Reaction Tube (nicht im Kit enthalten).

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

4. Bindung der Nucleinsäuren an einen Spin Filter

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

Die Probenlösung auf den Spin Filter (**Code S**) überführen 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 setzen.

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 50 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 eluierte DNA kann direkt in die PCR eingesetzt oder bis zu 24 Stunden bei +4°C gelagert werden. Bei längerer Lagerung sollte die DNA bei -20°C aufbewahrt werden.

3 Weitere Informationen

3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Validierungsdaten auf Anfrage
- Material Safety Data Sheet (Download: www.congen.de/eifu/)

3.2 Technischer Support

Bei Fragen zur Durchführung wenden sie sich bitte per E-Mail an info@congen.de.

1 General Information

1.1 Description

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

1.2 Kit components and storage

Kit Code	Reagent / Material	Amount (per box)
F	Membrane Filter (white with grid; pore size 0.45 µm) ***	50 x
L	Lysis Buffer	1 x 50 ml
B	Binding Buffer*	1 x 4 ml
W	Wash Buffer**	1 x 18 ml
E	Elution Buffer	1 x 10 ml
S	Spin Filter	1 x 50 Filter
R	Receiver Tubes 2.0 ml	1 x 50 Tubes
T	Receiver Tubes 1.5 ml	1 x 50 Tubes

* Adding isopropanol (not supplied with the kit, see 1.3 additionally required equipment and materials)

** Adding ethanol (not supplied with the kit, see 1.3 additionally required equipment and materials)

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

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

1.3 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 for preparation of Wash Buffer (puriss., purity ≥ 96%)
- isopropanol for preparation of Binding Buffer (e.g. Carl Roth 2-Propanol Rotipur® >99.7; Applichem 2-Propanol for microbiologie; Sigma-Aldrich 2-Propanol)
- disposal bags or waste bin
- autoclave
- biological safety cabinet

2 Protocol

2.1 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

2.2 Preparations

General

Add 11 ml isopropanol to the Binding Buffer **(Code B)** and mix thoroughly.

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 provided with the kit).

Equilibrate the Elution Buffer to 60°C. The Elution Buffer is necessary for step 7.

2.3 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 2023 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. Lysis of the basic material

Add 1 ml of Lysis Buffer **(Code L)** to the reaction tube and mix it briefly to ensure that the whole filter is completely surrounded by Lysis Buffer. Close the reaction tube with caps.

Incubate on a heating block under continuously shaking for 10 minutes at 95°C.

3. Setting of optimal binding conditions

Transfer 130 µl of the lysate into a new 1.5 ml reaction tube (not supplied with the kit).

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

4. Binding of the nucleic acids on a Spin Filter

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

Transfer the solution onto the Spin Filter. Incubate at room temperature for 1 min.

Centrifuge the Spin Filter with the Receiver Tube for 1 min at 12,000 rpm.

After centrifugation 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 at 1 min for 12,000 rpm.

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

Once more add 550 µl Wash Buffer (**Code W**) to the Spin Filter and centrifuge at 1 min for 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 final 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 50 µl of the preheated Elution Buffer (**Code E**) directly onto the Spin Filter.

Incubate for 3 min at room temperature.

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.

3 Further Information

3.1 Product Information

- Validation data upon request
- Material Safety Data Sheet (Download: www.congen.de/en/eifu/)

3.2 Technical Support

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