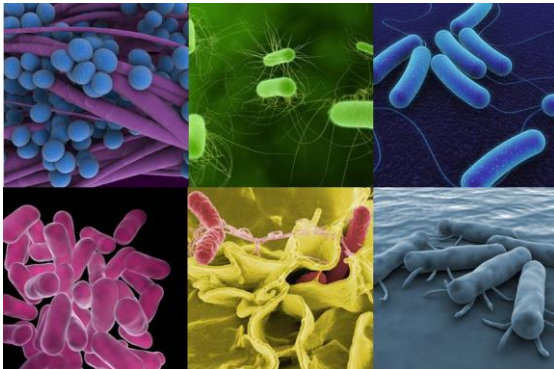


CONGEN

SureFast[®] Bacteria Screen RUO

Art. No. C7123RUO
100 rxn

User Manual



April 2020

 **Inhalt**

1	Allgemeines	3
1.1	Beschreibung	3
1.2	Nachweisgrenze	3
1.3	DNA-Präparation	3
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung	3
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	3
1.6	Geräteeinstellungen	4
1.7	Detektionskanaleinstellungen	4
2	Qualitative Analyse	5
2.1	Protokoll	5
2.1.1	Herstellen des Master-Mix	5
2.1.2	Herstellen des real-time PCR-Mix	6
2.2	Interpretation der Ergebnisse	6
3	Weitere Informationen	6
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	6
3.2	Technischer Support	6

 **Content**

1	General Information	7
1.1	Description	7
1.2	Limit of Detection	7
1.3	DNA-preparation	7
1.4	Kit components and storage	7
1.5	Additionally required equipment and materials	7
1.6	Setup	8
1.7	Detection channel Set-up	8
2	Qualitative Analysis	9
2.1	Protocol	9
2.1.1	Preparation of the master-mix	9
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix	9
2.2	Interpretation of results	10
3	Further Information	10
3.1	Product Information	10
3.2	Technical Support	10

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

SureFast® Bacteria Screen RUO ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis einer spezifischen DNA-Sequenz des 16S Targets von Bakterien DNA. Mit diesem Test werden alle bedeutsamen Bakterien-Spezies detektiert.

Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten verwendet werden.

Mit diesem sehr sensitiven Kit werden auch minimale DNA-Rückstände erfasst, was zu positiven Signalen der Negativkontrolle führt und somit die Nachweisgrenze des PCR-Verfahrens beeinflusst.

1.2 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze der SureFast® Bacteria Screen RUO real-time PCR hängt ab von der Reinheit der verwendeten Taq-Polymerase und liegt im Allgemeinen bei ca. 500 DNA-Kopien.

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

1.3 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation wird das SureFast® PREP Bacteria (Art. Nr. F1021) empfohlen.

1.4 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 11 µl	Rot
3	Positive Control	1 x 200 µl	Hellblau
4	PCR Water	1 x 500 µl	Weiß
5	Dilution Buffer	1 x 2000 µl	Dunkelgrün
6	Standard DNA (1x10 ⁶ Kopien/µl)	1 x 160 µl	Dunkelblau

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei –20°C zu lagern..

1.5 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- DNA-Extraktionskit (z.B. SureFast® PREP Bacteria Art. Nr. F1021)
- Real-time PCR Gerät
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

SureFast® Bacteria Screen RUO (100 rxn)

Art. Nr.
C7123RUO

April 2020

1.6 Geräteeinstellungen

	Blockcycler	Rotorcycler & LightCycler® 480 II
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	1 min, 95°C 45	1 min, 95°C 45
Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	15 sec, 95°C 30 sec, 60°C	10 sec, 95°C 15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum

1.7 Detektionskanaleinstellungen

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions- kanal	Quencher	Bemerkung
Roche LightCycler® 480 II	16S Target	465-510	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	16S Target	465-510	+	

2 Qualitative Analyse

2.1 Protokoll

2.1.1 Herstellen des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Folgende Kontrollen werden empfohlen: Negativkontrolle, Extraktionskontrolle, Standard Reihe und Positivkontrolle.

Benötigte Reaktionen für den Bacteria Screen-Nachweis:

7 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 1x Positivkontrolle, 4 x Standard DNA)

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

Des Weiteren wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, mischen und zentrifugieren.

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen:

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10%)
Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
Taq Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
Gesamtvolumen	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

2.1.2 Herstellen der Standard-DNA Verdünnungen

Für die Erstellung der Standardkurve wird die Standard DNA (**Code 6**) in 1:10 Schritten in Dilution Buffer (**Code 5**) verdünnt. Insgesamt werden 4 Verdünnungen benötigt. Es werden 4 Reaktionsgefäße (markiert mit S1 bis S4) vorbereitet und mit je 45 µl Dilution Buffer befüllt. Nach folgender Tabelle sind die Verdünnungen herzustellen:

Standard	Verdünnungen	Kopienanzahl je µl	Gesamtkopienanzahl je Reaktion*
S1	45 µl Dilution Buffer + 5 µl Standard DNA	100.000 Kopien	500.000 Kopien
S2	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S1	10.000 Kopien	50.000 Kopien
S3	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S2	1000 Kopien	5.000 Kopien
S4	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S3	100 Kopien	500 Kopien

***Hinweis:** Es werden 5 µl DNA im Reaktionsansatz verwendet. Die Gesamtkopienanzahl je Reaktion ist in das Setup File des Softwareprogramms des real-time PCR Gerätes einzutragen.

Die hergestellten Standard Verdünnungen sind nach der Verwendung bei -20°C bis zum nächsten Gebrauch aufzubewahren. Die Verdünnungen sind bis zu zwei Monate bei -20°C stabil. Vor dem erneuten Gebrauch sind die Lösungen vollständig aufzutauen, auf dem Vortex zu durchmischen und vor dem Öffnen zu zentrifugieren.

2.1.3 Herstellen des real-time PCR-Mix

- Pipettieren von 20 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß.
- Für die Negativkontrolle pipettieren von 5 µl PCR Water in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Gefäße.
- Pipettieren von 5 µl der Proben-DNA in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Gefäße.
- Pipettieren von 5 µl Positive Control und der Standard DNA Verdünnungen in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Gefäße.
- Kurzes Zentrifugieren der Reaktionsgefäße mit wenigen Umdrehungen pro Minute.
- Reaktionsgefäße in das real-time PCR Gerät einsetzen und entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

2.1.4 Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse wird mit der Analyse Software der jeweiligen real-time PCR Geräte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Aufgrund von Verunreinigungen der Taq Polymerase mit DNA-Resten zeigt auch die Negativkontrolle eine Amplifikation. Der Cp-Wert der Negativkontrolle liegt erfahrungsgemäß ca. bei 32. Die Positivkontrolle muss einen deutlich früheren Cp-Wert aufweisen (ca. 27-28). Die Kontrollreaktionen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen.

Eine Probe wird **positiv** bewertet, wenn der Cp-Wert der Proben-DNA um mindestens zwei Zyklen niedriger ist, als der Cp-Wert der Negativkontrolle.

Eine Probe wird als **negativ** bewertet, wenn der Cp-Wert der Proben-DNA um weniger als zwei Zyklen von dem der Negativkontrolle unterscheidet.

Sollte die Probe im Gegensatz zur Negativkontrolle keine Amplifikation zeigen, sind in der Proben PCR-Inhibitoren enthalten. Die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe muss verbessert werden.

3 Weitere Informationen

3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte (Download: www.congen.de/unternehmen/download)
- Validierungsdaten auf Anfrage

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

The SureFast® Bacteria Screen RUO is a real-time PCR for the direct, qualitative detection of a specific DNA sequence of 16S target.

The real-time PCR assay can be performed with commonly used real-time PCR instruments.

Due to the high sensitivity of this kit even minimal residues of DNA in Taq polymerase can be detected. This results in positive signals of the negative controls and influences the limit of detection of the PCR.

1.2 Limit of Detection

The limit of detection of the Bacteria Screen real-time PCR depends on the purity of the used Taq Polymerase and is generally about 500 DNA-copies.

The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, DNA preparation and DNA content.

1.3 DNA-preparation

For DNA-preparation the use of SureFast® PREP Bacteria (Art. No. F1021) is recommended.

1.4 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 11 µl	Red
3	Positive Control	1 x 200 µl	Light Blue
4	PCR Water	1 x 500 µl	White
5	Dilution Buffer	1 x 2000 µl	Dark Green
6	Standard DNA (1x10 ⁶ Kopien/µl)	1 x 160 µl	Dark Blue

Store all reagents at –20°C and protected from light.

1.5 Additionally required equipment and materials

- DNA-Extraction kit (e.g. SureFast® PREP Bacteria Art. No. F1021)
- real-time PCR instrument with two detection channels
- real-time PCR consumable (plates, tubes, capillaries, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- powder-free disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

SureFast[®] Bacteria Screen RUO (100 rxn)

Art. No.
C7123RUO

April 2020

1.6 Setup

	Blockcycler &	Rotorcycler & LightCycler[®] 480 II
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	1 min, 95°C 45	1 min, 95°C 45
Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	15 sec, 95°C 30 sec, 60°C	10 sec, 95°C 15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum

1.7 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Roche LightCycler[®] 480 II	16S Target	465-510	+	
Roche cobas[®] z 480 Analyzer	16S Target	465-510	+	

2 Qualitative Analysis

2.1 Protocol

2.1.1 Preparation of the master-mix

Calculate the total number of reactions needed (samples and control reactions) for the specific PCR assay.

Recommended control reactions for the specific PCR assay: negative control, extraction control, positive control and standard DNA dilution

Reactions needed for the qualitative Bacteria Screen detection:

7 reactions for controls (1x no-template control, 1x extraction control, 1x positive control ; 4x standard DNA dilution)

For each sample: at least 1 reaction for each sample DNA

It is also recommended to prepare the master-mix with 10 % additional volume in order to compensate reagent loss. Allow the reagents to thaw, mix and centrifuge before opening and use.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

Components of the master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
Reaction Mix	19.9 µl	218.9 µl
Taq Polymerase	0.1 µl	1.1 µl
Total volume	20 µl	220 µl

Mix each master-mix well and centrifuge shortly before use.

2.1.2 Preparation of the standard DNA dilutions

Dilute the Standard DNA (**Code 6**) in 1:10 steps in Dilution Buffer (**Code 5**) in order to prepare different concentrations. Prepare a dilution series of 4 steps. Prepare 4 reaction tubes (labelled S1 to S4) and add 45 µl Dilution Buffer each. The following procedure is recommended:

Standard	dilutions	copy number per µl	final copy number per reaction*
S1	45 µl Dilution Buffer + 5 µl Standard DNA	100.000 copies	500.000 copies
S2	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S1	10.000 copies	50.000 copies
S3	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S2	1000 copies	5.000 copies
S4	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S3	100 copies	500 copies

***Note:** 5 µl of standard DNA are used for each calibration point. The final copy number per reaction is to be entered in the analysis software of the real-time PCR detection system.

If the diluted DNA standards (S1 to S4) are not immediately used, store them at -20°C. The dilution series are stable up to two months at -20°C. Before use allow the reagents to thaw, mix them on a vortex and centrifuge carefully before use.

2.1.3 Preparation of the real-time PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells.
- Negative control: pipette 5 µl of PCR Water into the designated tubes/wells and close them.
- Pipette 5 µl of sample DNA into the designated tubes/wells and close them.
- Pipette 5 µl of Positive Control and the standard DNA dilution into the designated tubes/wells and close them.
- Centrifuge all tubes/plates or capillaries shortly at low speed.
- Place tubes/plates into the real-time PCR instrument and start the run according to the setup.

2.2 Interpretation of results

The evaluation has to be made according to the usual analysis program recommended by the real-time PCR instrument manufacturer. Due to contaminations of the Taq Polymerase with DNA the negative control shows amplification. Experience has shown that the Cp of the negative control is about 32. The positive control need to have a Cp around 27-28.

A sample is stated **positive**, if the Cp-value of the sample DNA is at least two cycles earlier than the Cp-value of the negative control. A sample is stated **negative**, if the Cp-value difference between the sample DNA and the negative control is less than two.

In case the sample shows no amplification contrary to the negative control, the sample contains PCR-inhibiting substances. Under these circumstances an evaluation of the sample is not possible. DNA isolation and purification for the sample need to be improved.

3 Further Information

3.1 Product Information

- Detailed information about setup of several real-time PCR devices
(Download: www.congen.de/en/company/downloads)
- Validation Report upon request

3.2 Technical Support

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