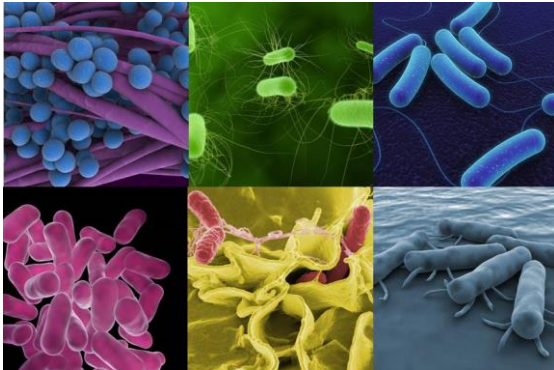


**CONGEN**

# **SureFast<sup>®</sup> Bacteria Screen RUO**

Art. No. C7123RUO  
100 rxn

## **User Manual**



**February 2024**



## **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 der Standard-DNA Verdünnungen.....	5
2.1.3	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	Additional 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 standard DNA dilutions .....	9
2.1.3	Preparation of the real-time PCR-mix .....	10
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. Die technische Geräteverifizierung erfolgte am Roche LightCycler® 480 II, Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96Dx, Agilent Aria Dx und RIDA®CYCLER.

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 1050 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	80 µl	Dunkelrot
3	Positive Control	200 µL	Hellblau
4	PCR Water	450 µl	Weiß
5	Dilution Buffer	1800 µl	Dunkelgrün
6	Standard DNA	160 µl	Dunkelblau

**Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei –28°C bis -16°C zu lagern. Die Taq Polymerase kann bei mehrfacher Verwendung am selben Tag bei +2 bis +8°C gelagert werden.**

**Hinweis: Die Taq Polymerase kann in gefrorenem oder nicht gefrorenem Zustand vorliegen. Dies hat keinen Einfluss auf die Qualität der Taq Polymerase oder die Performance der real-time PCR.**

### 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

**1.6 Geräteeinstellungen**

	<b>Blockcycler</b>	<b>LightCycler® 480 II R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>
RT Reaction	10 min, 58°C	10 min, 58°C
Initial Denaturation (HOLD)	1 min, 95°C	1 min, 95°C
Cycles	45	45
Denaturation	15 sec, 95°C	10 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	30 sec, 60°C	15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum

**1.7 Detektionskanaleinstellungen**

<b>Real-time PCR Gerät</b>	<b>Nachweis</b>	<b>Detektions- kanal</b>	<b>Quencher</b>	<b>Bemerkung</b>
<b>Agilent Aria Dx/Mx BioRad CFX96/Dx</b>	16S Target	FAM	+	
	16S Target	FAM	+	
<b>Qiagen Rotor- Gene Q</b>	16S Target	green	+	Achtung: Nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden.
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	16S Target	green	+	
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	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, Standardreihe 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	19,3 µl	212,3 µl
Taq Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

**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.

## 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.

## 2.2 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](http://www.congen.de/unternehmen/download))
- Verifizierungsdaten auf Anfrage

### 3.2 Technischer Support

Bei Fragen zur Durchführung wenden sie sich bitte per E-Mail an [info@congen.de](mailto: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. This test detects all significant bacterial species.

The real-time PCR assay can be performed with commonly used real-time PCR instruments. The technical verification of instruments was performed on Roche LightCycler® 480 II, Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96Dx, Agilent Aria Dx and RIDA®CYCLER.

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. Nr. F1021) is recommended.

### 1.4 Kit-components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	2 x 1050 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	80 µl	Dark Red
3	Positive Control	200 µL	Light Blue
4	PCR Water	450 µl	White
5	Dilution Buffer	1800 µl	Dark Green
6	Standard DNA	160 µl	Dark Blue

**Store all reagents at -28°C to -16°C and protected from light. The Taq Polymerase can be stored at +2 to +8°C for multiple uses on the same day.**

**Note: The Taq Polymerase may be in a frozen or unfrozen state. This does not affect the quality of the Taq Polymerase or the performance of the real-time PCR.**

### 1.5 Additional required equipment and materials

- DNA-Extraction kit (e.g. SureFast® PREP Bacteria Art. No. F1021)
- real-time PCR instrument
- 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



**1.6 Setup**

	<b>Blockcycler</b>	<b>LightCycler® 480 II R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>
RT-Reaction	10 min, 58°C	10 min, 58°C
Initial Denaturation (HOLD)	1 min, 95°C	1 min, 95°C
Cycles	45	45
Denaturation	15 sec, 95°C	10 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	30 sec, 60°C	15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum

**1.7 Detection channel Set-up**

<b>Real-time PCR device</b>	<b>Detection</b>	<b>Detection channel</b>	<b>Quencher</b>	<b>Note</b>
<b>Agilent Aria Dx/Mx</b>	16S Target	FAM	+	
<b>BioRad CFX96/Dx</b>	16S Target	FAM	+	
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	16S Target	green	+	Note: Please use only 0.1 ml reaction tubes.
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	16S Target	green	+	
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	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 negative 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	19.3 µl	212.3 µl
Taq Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
<b>Total volume</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

**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.

## 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 designed 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 needs 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](http://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](mailto:info@congen.de).