

Biotest MMB Prep Listeria

Manual

Version 06.09

Biotest MMB Prep Listeria (2x 50 Preps)
Art. No. 944 515

für die Isolierung von Listeria-DNA/
for the isolation of Listeria DNA

Inhaltsverzeichnis / Contents

DEUTSCH

INHALTSVERZEICHNIS / CONTENTS.....	1
EINLEITUNG	2
VERWENDUNGSZWECK	2
BESTANDTEILE PRO KIT (50 PRÄPARATIONEN) UND LAGERUNG	2
QUALITÄTSKONTROLLE	3
HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	3
PROTOKOLL	3
WEITERE INFORMATIONEN	5
ENGLISH	
INTRODUCTION	6
INTENDED USE	6
KIT COMPONENTS (50 PREPARATIONS) AND STORAGE	6
QUALITY CONTROL.....	6
WARNING AND PRECAUTIONS.....	7
PROTOCOL.....	7
ADDITIONAL INFORMATION.....	9
ORDER INFORMATION.....	10

Einleitung

Listeriose ist eine beim Menschen nicht sehr häufige (in Deutschland ca. 100-200 Fälle/Jahr), jedoch sehr schwere Infektionskrankheit mit einer hohen Sterblichkeitsrate, die überwiegend durch Lebensmittel übertragen wird. Der Erreger ist das Bakterium *Listeria monocytogenes* (verschiedene Serovare). Immungeschwächte Personen, alte Menschen, Schwangere, Ungeborene und Kleinstkinder sind sehr anfällig für diese Erkrankung. Die Infektion wird auf den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln zurückgeführt.

Die real-time PCR-Methode ermöglicht im Gegensatz zu klassischen mikrobiologischen Kulturmethode eine sensitive Überprüfung von Rohstoffen und prozessierten Lebensmitteln auf Abwesenheit von Salmonellen in kürzester Zeit.

Das **Biotest MMB Prep Listeria** Kit dient zur Aufreinigung der Bakterien-DNA, die als Template für die PCR-Analyse direkt eingesetzt werden kann.

Verwendungszweck

Dieses Kit dient der Extraktion von Listeria-DNA aus Anreicherungskulturen von Lebensmittelproben.

Bestandteile pro Kit (50 Präparationen) und Lagerung

- 1x Lysis Buffer (20 ml)
- 1x Binding Buffer (10 ml)
- 1x Pre-Wash Buffer (60 ml, nach Zugabe von 30 ml Ethanol ((absolut), nicht im Kit enthalten)
- 1x Wash Buffer (60 ml, nach Zugabe von 42 ml Ethanol ((absolut), nicht im Kit enthalten)
- 1x Elution Buffer (10 ml)

- 2x Receiver Tube 2 ml (50 x)
- 1x Receiver Tube 1,5 ml (50 x)
- 2x Spin Filter (50 x)

Alle Bestandteile des Kits werden trocken und bei Raumtemperatur (14-25 °C) gelagert.

Benötigte Reagenzien, die nicht in diesem Set enthalten sind

- Ethanol (absolut, >96 %)

Equipment und Verbrauchsmaterial

- Mikrozentrifuge
- Thermomixer / Heizblock (bis 100 °C)
- Pipetten
- Sterile DNA-freie Filterspitzen
- Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml

Qualitätskontrolle

Dem Biotest Qualitätsmanagement-System entsprechend, wird jedes Lot der Biotest MMB Prep Kits auf festgelegte Spezifikationen getestet, um eine gleichbleibende Produktqualität zu sichern.

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Nicht für *in vitro* Diagnostik geeignet.

Achtung: Der Test muss von gut ausgebildeten und autorisierten Laboranten durchgeführt werden.

Achtung: Alle Reagenzien sollten nach den Richtlinien guter Laborpraxis gehandhabt und unter entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen verwendet werden.

Achtung: Biologische Proben können infektiöse Erreger enthalten. Bitte beachten Sie entsprechende Vorsichtsmaßnahmen, z. B. das regelmäßige Überprüfen der Handschuhe auf Kontaminationen mit Probenmaterial.

Achtung: Verwenden Sie Reagenzien nicht mehr nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums auf dem Etikett.

Achtung: Verwenden Sie Reagenzien nicht bei nachweislicher Trübung oder mikrobiologischer Kontamination.

Weitere Informationen entnehmen Sie bitte den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (MSDS). Diese sind im PDF-Format online auf der Biotest-Homepage www.biotest.de abrufbar. In dem Bereich Microbiological Tests & Systems können Sie für jedes BIOTEST MMB Prep Kit und Kitbestandteil die Sicherheitsdatenblätter finden, ansehen und ausdrucken.

Protokoll

Vor der ersten Nutzung muss dem Pre-Wash Buffer 30 ml Ethanol (absolut) zugegeben und gut gemischt werden.

Vor der ersten Nutzung muss dem Wash Buffer 42 ml Ethanol (absolut) zugegeben und gut gemischt werden.

Vor jeder Präparation muss die benötigte Menge des Elution Buffer in ein Reaktionsgefäß überführt und auf 65 °C erwärmt werden.

Vorbereitung des Ausgangsmaterials

1. Je 1 ml einer Bakterienkultur oder entsprechendem Untersuchungsmaterials werden unter sterilen Bedingungen entnommen und in ein 1,5 ml Probengefäß überführt (nicht im Kit enthalten).
2. Die Proben werden für 5 Minuten bei 14.000 x g zentrifugiert.
3. Der Überstand wird sorgfältig abpipettiert und verworfen.

Lyse des Ausgangsmaterials

4. Zugabe von 400 µl* **Lysis Buffer** zu der Probe. Im Anschluss die Probe gut vermischen und die Reaktionsgefäße sicher (evt. mit einer Klammer) verschließen.
5. Inkubation bei 99 °C für 10 min unter kontinuierlichem Schütteln.

* Das Volumen kann in Abhängigkeit von der Matrix auf bis zu 1 ml erhöht werden. Fragen zur Durchführung bitte per E-Mail an hycon@biotest.de.

Einstellen optimaler Bindungsbedingungen

6. Zentrifugation des Lysates für 1 min bei 14.000 x g.
7. Einen **Spin Filter** in ein gelbes 2 ml **Receiver Tube** setzen.
8. Max 800 µl des Überstands in den Spin Filter überführen.
9. Zentrifugation für 1 min bei 14.000 x g.
10. Spin Filter verwerfen.

Hinweis: In Abhängigkeit von den Matrixeigenschaften kann das Volumen nach der Zentrifugation geringer ausfallen. In diesem Fall das erhaltene Volumen einsetzen.

Bindung der DNA an die Filtermembran

11. 200 µl des **Binding Buffers** zu dem Filtrat geben und gut mischen.
12. Einen neuen **Spin Filter** in ein neues gelbes 2 ml **Receiver Tube** setzen.
13. Max. 800 µl der Probe auf den Filter geben und für 1 min bei Raumtemperatur inkubieren.
14. Zentrifugation für 1 min bei 14.000 x g.
15. Durchfluss verwerfen und den Spin Filter wieder in das gleiche Receiver Tube einsetzen.

Reinigung der gebundenen DNA

16. 550 µl **Pre-Wash Buffer** auf den Spin Filter geben. Zentrifugation für 1 min bei 14.000 x g. Filtrat verwerfen und den Spin Filter wieder in das gleiche Receiver Tube einsetzen.
17. 550 µl **Wash Buffer** auf den Spin Filter geben. Zentrifugation für 1 min bei 14.000 x g. Filtrat verwerfen und den Spin Filter wieder in das gleiche Receiver Tube einsetzen.
18. 550 µl **Wash Buffer** auf den Spin Filter geben. Zentrifugation für 1 min bei 14.000 x g. Filtrat verwerfen und den Spin Filter wieder in das gleiche Receiver Tube einsetzen.

Trocknen des Spin Filters

19. Zentrifugation für 2 min bei 14.000 x g, um Ethanolreste von dem Spin Filter vollständig zu entfernen.

Elution der DNA vom Spin Filter

20. Spin Filter in ein neues (farbloses) 1,5 ml **Receiver Tube** setzen.
21. Zugabe von 100 µl des erwärmten **Elution Buffers** (65 °C).
22. Inkubation für 3 min bei Raumtemperatur.
23. Zentrifugation für 1 min bei 10.000 x g. Spin Filter anschließend verwerfen.

Die eluierte DNA kann unmittelbar 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.

Weitere Informationen

Für allgemeine Anfragen oder Bestellungen kontaktieren Sie bitte Ihren lokalen Biotest-Händler:

Kunden aus Deutschland können den Customer Service unter:

Telefon: +49 (0) 6103 801-496

Fax: +49 (0) 6103 801-505

mail@biotest.de

erreichen.

Für technische/applikative Anfragen kontaktieren Sie bitte unseren technischen Support unter:

Telefon: +49 (0) 6221 72651-30

Fax: +49 (0) 6221 72651-39

hycon@biotest.de

Introduction

Listeriosis is a infectious disease with low incidence (in Germany 100-200 cases/year) but high mortality rates, which is caused by food contaminated with bacteria of the species *Listeria monocytogenes* (different serovars). Immunocompromised people, elderly, pregnant, foetuses and neonates are especially susceptible for Listeriosis.

The real-time PCR method , in contrast to classic microbiological culture methods, enables the rapid and sensitive testing of raw material and processed food for absence of *Listeria*.

The **Biotest MMB Prep Listeria** kit can be used for template preparation for PCR analysis.

Intended Use

The kit is intended to be used for the isolation of Listeria DNA from enrichment cultures of food samples..

Kit Components (50 preparations) and Storage

- 1x Lysis Buffer (20 ml)
- 1x Binding Buffer (10 ml)
- 1x Pre-Wash Buffer (60 ml, after adding 30 ml ethanol (absolute, not included in the kit)
- 1x Wash Buffer (60 ml, after adding 42 ml ethanol (absolute, not included in the kit)
- 1x Elution Buffer (10 ml)

- 2x Receiver Tube 2 ml (50 x)
- 1x Receiver Tube 1.5 ml (50 x)
- 2x Spin Filter (50 x)

All kit components are stored dry and at room temperature (14-25 °C).

Additional required reagents

Ethanol (absolute, >96 %)

Additional required equipment and disposables

- Microcentrifuge
- Thermomixer / heating block (100 °C)
- Adjustable pipettes
- Sterile DNA-free filter tips
- 1.5 ml and 2 ml microcentrifuge tubes

Quality Control

According to the Quality Management System, each lot of Biotest MMB Prep Kits is tested against predetermined specifications to ensure consistent product quality.

Warning and Precautions

Not for *in vitro* diagnostic use.

- Caution:** The test must be performed by well-trained and authorized laboratory technicians.
- Caution:** All reagents should be handled in accordance with good laboratory practice taking appropriate precautions.
- Caution:** Biological samples can contain infectious agents. Follow all appropriate precautions, e.g., the regular check of gloves for contamination with sample material.
- Caution:** Do not use reagents past the expiration date printed on the label.
- Caution:** Do not use reagents with any evidence of turbidity or microbial contamination.

For more information, please consult the appropriate material safety data sheets (MSDS). These are available online in PDF format at www.biotest.de. In the section Microbiological Tests & Systems you can find, view, and print the MSDS for each Biotest MMB Prep kit and kit component.

Protocol

Before using the kit for the first time add 30 ml ethanol absolute to the Pre-Wash Buffer and mix thoroughly.

Before using the kit for the first time add 42 ml ethanol absolute to the Wash Buffer and mix thoroughly.

Before each isolation procedure the required amount of Elution Buffer is transferred to a reaction tube and pre-warmed to 65 °C.

Preparation of starting material

1. Transfer 1 ml of the enrichment culture under sterile conditions into a 1.5 ml reaction tube (not provided with the kit).
2. Centrifuge for 5 min at 14,000 x g.
3. Remove and discard supernatant by pipetting.

Lysis of starting material

4. Add 400 µl* of **Lysis Buffer**, mix briefly and close the reaction tube tightly.
5. Incubate under continuous shaking for 10 min at 99 °C.

* The volume depends on the specific sample matrix. It is possible to vary the volume up to 1.0 ml. For further questions please send contact to hycon@biotest.de.

Setting of optimal binding conditions

6. Centrifuge for 1 min at 14,000 x g.
7. Place a **Spin Filter** into yellow **2 ml Receiver Tube**.
8. Transfer max. 800 µl supernatant onto the spin filter.
9. Centrifuge for 1 min at 14,00 x g.
10. Discard spin filter.

Note: Depending on the sample a smaller amount of liquid maybe obtained after centrifugation, in this case take the actual volume.

Binding of the DNA to a Spin Filter

11. Add 200 µl **Binding Buffer** to the filtrate and mix the sample.
12. Place a new **Spin Filter** into a new yellow **2 ml Receiver Tube**.
13. Transfer max 800 µl of the sample directly onto the filter and incubate at room temperature for 1 min.
14. Centrifuge for 1 min at 14,000 x g.
15. Discard the flow-through and place the spin filter back into the same receiver tube.

Purification of the bound DNA

16. Add 550 µl **Pre-Wash Buffer** to the spin filter and centrifuge for 1 min at 14,000 x g. Discard the flow-through and place the spin filter back into the same receiver tube.
17. Add 550 µl **Wash Buffer** to the spin filter and centrifuge for 1 min at 14,000 x g. Discard the flow-through and place the spin filter back into the same receiver tube.
18. Add 550 µl **Wash Buffer** to the spin filter and centrifuge for 1 min at 14,000 x g. Discard the flow-through and place the spin filter back into the receiver tube.

Drying of the Spin Filter

19. Remove the residual ethanol by final centrifugation for 2 min at 14,000 x g.

Elution of nucleic acids from the Spin Filter

20. Place the spin filter into a clear **1.5 ml Receiver Tube**.
21. Add 100 µl of the preheated **Elution Buffer** (65 °C) directly onto the spin filter.
22. Incubate 3 min at room temperature.
23. Centrifuge for 1 min at 10,000 x g. After centrifugation discard the spin filter.

The eluted DNA is ready-to-use for PCR analyses. 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.

Additional Information

For any inquiries or to place an order, contact your local Biotest distributor.

Domestic customers in Germany may contact Customer Service at:

Phone: +49 (0) 6103 801-496

Fax: +49 (0) 6103 801-505

mail@biotest.de

For technical inquiries please contact our Technical Support at:

Phone: +49 (0) 6221 72651-30

Fax: +49 (0) 6221 72651-39

hycon@biotest.de

Order Information

Product Name	Article No.	Package Size
Biotest MMB Prep Bacteria	944 501	100 preparations
Biotest MMB Prep Salmonella	944 505	100 preparations
Biotest MMB Prep Campylobacter	944 511	100 preparations
Biotest MMB Prep Listeria	944 515	100 preparations
Biotest MMB Prep E. coli	944 521	100 preparations
Biotest MMB Prep DNA/RNA virus	944 702	50 preparations
Biotest MMB Salmonella (V)	944 011	100 reactions
Biotest MMB Salmonella (R)	944 012	100 reactions
Biotest MMB Salmonella (LC)	944 013	100 reactions
Biotest MMB Campylobacter (V)	944 021	100 reactions
Biotest MMB Campylobacter (R)	944 022	100 reactions
Biotest MMB Campylobacter (LC)	944 023	100 reactions
Biotest MMB Listeria monocytogenes (V)	944 031	100 reactions
Biotest MMB Listeria monocytogenes (R)	944 032	100 reactions
Biotest MMB Listeria monocytogenes (LC)	944 033	100 reactions
Biotest MMB STEC Screening (V)	944 041	100 reactions
Biotest MMB STEC Screening (R)	944 042	100 reactions
Biotest MMB STEC Screening (LC)	944 043	100 reactions
Biotest MMB Staphylococcus aureus (V)	944 051	100 reactions
Biotest MMB Listeria Screening (V)	944 061	100 reactions
Biotest MMB Vibrio cholerae (V)	944 071	100 reactions
Biotest MMB Legionella pneumophila (V)	944 081	100 reactions
Biotest MMB Clostridium perfringens (V)	944 091	100 reactions
Biotest MMB Bacillus cereus (V)	944 101	100 reactions
Biotest MMB Legionella Screening (V)	944 111	100 reactions
Biotest MMB Norovirus (V)	944 204	50 reactions

Biotest Subsidiaries

Headquarters Germany

Biotest AG

Landsteinerstr. 5
63303 Dreieich
Germany
Tel.: +49 6103 8 01-0
Fax: +49 6103 8 01-130
www.biotest.de
mail@biotest.de

Biotest AG

Technology Center Microbiology
Wernher von Braun Straße 9
69214 Eppelheim/Germany
Tel.: +49 6221 726 5130
Fax: +49 6221 726 5139
Sales: +49 6103 801 496
www.biotest.com
hycon@biotest.de

Austria

Biotest Austria GmbH
Einsiedlergasse 58
1053 Wien
Tel.: +43 1-5 4 51 56 10
Fax: +43 1-5 4 51 56 139
info@biotest.at

Great Britain

Biotest (UK) Ltd.
Unit 28
Monkspath Business Park
Highlands Road/
Shirley, Solihull
West Midlands B90 4NZ
Tel.: +44 121-7 33 33 93
Fax: +44 121-7 33 30 66
biotestuk@biotestuk.com

Japan

Biotest K.K. (Japan)
Daini Yasuda Bldg. 2F
3-32-13, Tsuruya-cho, Kanagawa-
ku,
Yokohama-shi Kanagawa-ken
221-0835
Tel: +81-45-317-5111
Fax: +81-45-317-5110
elmar_dresbach@biotest.de

Benelux

Biotest Seralc° nv/sa
Generaal De Wittelaan 17B bus 14
2800 Mechelen
Belgium
Tel: +32-15 28 50 50
Fax: +32 15 28 50 55
info@biotest.be

Hungary

Biotest Hungaria Kft.
Torbágy u. 15/A
2045 Törökbálint
Tel.: +36 23 511-311
Fax: +36 23 511-310
biotest@biotest.hu

Switzerland

Biotest (Schweiz) AG
Schützenstr. 17
5102 Rapperswil
Tel.: +41 62-88 90 000
Fax: +41 62-88 90 001
mail@biotest.ch

France

Biotest S. a. r. l.
Zone Industrielle Centre
375, Rue Morane Saulnier
BP 65
78534 Buc Cedex
Tel.: +33 1-39 20 20 80
Fax: +33 1-39 20 20 81
info@biotest.fr

Italy

Biotest Italia S.r.l.
Via Leonardo da Vinci, 43
20090 Trezzano sul Naviglio
Tel.: +39 02 484291
Fax: +39 02 48402783
info@biotest-italia.com

USA

Biotest Diagnostics Corporation
400 Commons Way
Rockaway, NJ 07866
Tel: +1-973-625-1300
Fax: +1-973-625-9454
info@biotestUSA.com