



iQ-Check Free DNA Removal Solution for Food, Water, and Environmental Samples

Catalog #	Description
3594970	iQ-Check Free DNA Removal Solution , 1 vial (175 mg lyophilized powder) iQ-Check Free DNA Removal Reagent; 1 vial (9 ml) iQ-Check 10x Activation Buffer

For laboratory use only.

Intended Use

Since PCR became the method of choice for routine testing, one of its major challenges has been the potential detection of DNA from dead cells. For iQ-Check methods, the Free DNA Removal Solution, which can easily be integrated with iQ-Check and Aquadien DNA extraction workflows, provides an ideal way to remove free DNA from food, water, and environmental samples prior to PCR analysis. While the DNA in intact and living cells is protected, the free DNA from the sample, and any that is present due to different industrial processes, will be degraded.

iQ-Check Free DNA Removal Solution for Enriched Food and Environmental Samples

Principle

The degradation of free DNA is performed by a select enzyme and its specific buffer under optimized conditions. This enzymatic treatment ensures that the enriched broths are devoid of free DNA prior to DNA extraction. Then, the iQ-Check Lysis Buffer in combination with thermal lysis inactivates the enzyme, allowing for the extraction of DNA from intact and living cells. This enzymatic solution performs as well as ethidium monoazide (EMA) or propidium monoazide (PMA) treatments but in a much easier and simpler way.

The iQ-Check Free DNA Removal Solution is recommended for analysis of:

- Heat processed/cooked matrices (for example, milk powders and subcomponents)
- Products treated with phage interventions
- Environmental samples submitted to cleaning agents and potentially carrying dead cells

Using the iQ-Check Free DNA Removal Solution results in an average 2-3 log (approximately 6 quantification cycle [Cq] values) reduction in signal from free DNA. A complete performance report is available on request.

Kit Components

iQ-Check Free DNA Removal Reagent (G1)	1 vial (175 mg lyophilized powder)
iQ-Check 10x Activation Buffer (G2)	1 vial x 9 ml

Shelf Life and Shelf Life and Storage

Once received, the kit must be stored at 2–8°C. An unopened kit can be used until the expiration date indicated on the labels. The shelf life of activated solution (rehydrated G1 +G2) is 24 hr at room temperature, 7 days at 2–8°C, and 3 months at -20°C. Before reusing, allow the vial to thaw to room temperature. It is recommended to aliquot the activated reagent: 1 ml is needed for 96 tests when performing the easy DNA extraction protocol (10 µl* reagent/100 µl of enriched sample).

*For the iQ-Check *Vibrio* DNA extraction workflow, dispense 20 µl.

Required Materials Not Supplied

This list is not exhaustive.

Equipment

- All usual laboratory equipment
- 1,000 µl micropipet
- Thermoshaker capable of maintaining 37 ± 2°C (catalog #3594995)

Supplies

- Sterile distilled water or Milli-Q Water
- Sterile filter tips, adaptable to 1,000 µl
- Specific for extraction in a deep well plate
 - 1 ml deep well microplate (catalog #3594900)
 - X-Pierce Film (catalog #3593977, 3600040 in U.S. and Canada)
- Powder-free gloves
- Decontaminating agent, such as DNA AWAY or RNase AWAY
- Visit bio-rad.com/iqcheck for a list of iQ-Check Food Kits

Precautions

- Respect Good Laboratory Practice (EN ISO 7218). Appropriate protection, such as gloves and lab coats, should be worn when working with potentially infectious live bacteria
- This protocol must be performed by adequately trained personnel
- All potentially infectious material should be autoclaved before disposal
- The quality of results depends on strict compliance with the following Good Laboratory Practices, especially concerning PCR:
 - The laboratory equipment (pipets, tubes, etc.) must not circulate from one workstation to another
 - It is essential to use a positive control and a negative control for each series of amplification reactions
 - Do not use reagents after their expiration date
 - Periodically verify the accuracy and precision of pipets and the correct functioning of the instruments
 - Change gloves often, especially if you suspect they are contaminated
 - Clean workspaces periodically with at least 5% bleach and a decontaminating agent like DNA AWAY
 - Use powder-free gloves
- It is strongly advised to follow the general requirements described in the standard EN ISO 22714:2005, "Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – General requirements and definitions"
- For SDS product safety information and certificate of analysis, visit bio-rad.com

Protocol

Please read the entire protocol before starting the assay.

Sample Enrichment

Follow the recommended instructions indicated in each iQ-Check Kit user guide.

iQ-Check Free DNA Removal Treatment

Activation of the iQ-Check Free DNA Removal Solution

- Rehydrate the freeze-dried reagent G1 in 1 ml of distilled or Milli-Q water for 5–10 min at room temperature. Gently mix by inverting the vial. DO NOT VORTEX
- After hydration, transfer G1 (1 ml) to the activation buffer vial (G2, 9 ml). Gently mix by inverting the vial

The solution is now activated and ready to use. You will need 1 ml of the activated solution (G1 and G2) to perform 96 tests using the Easy DNA Extraction Protocol (10 µl* reagent/100 µl enriched sample).

Treatment with the Activated Solution (G1 + G2)

Before starting the test, turn on the thermoshaker and set it to 37 ± 2°C.

- Dispense 10 µl* of activated solution (G1 + G2) into as many wells of an empty deep well microplate as there are samples to be analyzed
- Add 100 µl of decanted enriched sample per well. Avoid matrix debris or fat layers
- Seal the deep well microplate with the X-Pierce Sealing Film
- Incubate the sealed deep well microplate in the thermoshaker WITHOUT shaking at 37 ± 2°C for 15–30 min

*For the iQ-Check *Vibrio* DNA extraction workflow, dispense 20 µl.

iQ-Check Protocols

Proceed to the Easy DNA Extraction Protocols (I or II) using the 100 µl of treated enriched sample in 100 µl of lysis reagent following Bio-Rad's recommendations in the user guide of the iQ-Check PCR Kit. Be sure that the thermoshaker has reached 95–100°C to properly inactivate the iQ-Check Free DNA Removal Solution.

Validations

The iQ-Check Free DNA Removal Solution has been validated for a wide range of applications. Refer to the user guide for each iQ-Check PCR Kit for specific details.

iQ-Check Free DNA Removal Solution for *Legionella*

Principle

The degradation of free DNA is performed by a select enzyme and its specific buffer under optimized conditions. This enzymatic treatment ensures that samples are devoid of free DNA prior to DNA extraction. Then, the iQ-Check Lysis Buffer in combination with thermal lysis inactivates the enzyme, allowing for the extraction of DNA from intact and living cells.

The iQ-Check Free DNA Removal Solution is recommended for analysis of environmental samples for *Legionella* testing. Using the iQ-Check Free DNA Removal Solution results in up to 2.5 log (approximately 6 Cq values) reduction in signal from free DNA.

Kit Component

Free DNA Removal Solution Kit (10 x 96 tests)

iQ-Check Free DNA Removal Reagent (G1)	1 vial (175 mg lyophilized powder)
iQ-Check 10x Activation Buffer (G2)	1 vial x 9 ml

Shelf Life and Shelf Life and Storage

Once received, the kit must be stored at 2–8°C. An unopened kit can be used until the expiration date indicated on the labels.

The shelf life of activated solution (rehydrated G1 +G2) is 24 hr at room temperature, 7 days at 2–8°C, and 3 months at -20°C. Before reusing, allow the vial to thaw to room temperature. It is recommended to aliquot the activated reagent for storage (40 µl are necessary for each sample).

Required Materials Not Supplied

This list is not exhaustive.

Equipment

- All usual laboratory equipment
- 1,000 µl micropipet
- Thermoshaker capable of maintaining 37 ± 2°C (catalog #3594986)

Supplies

- *Legionella* DNA Free Water (catalog #12006823)
- Sterile filter tips, adaptable to 1,000 µl
- 2 ml tubes for Aquadien short protocol
- Powder-free gloves
- Decontaminating agent, such as DNA AWAY or RNase AWAY

Precautions

- Respect Good Laboratory Practice (EN ISO 7218). Appropriate protection, such as gloves and lab coats, should be worn when working with potentially infectious live bacteria
- This protocol must be performed by adequately trained personnel
- All potentially infectious material should be autoclaved before disposal
- The quality of results depends on strict compliance with the following Good Laboratory Practices, especially concerning PCR:
 - The laboratory equipment (pipets, tubes, etc.) must not circulate from one workstation to another
 - It is essential to use a positive control and a negative control for each series of amplification reactions
 - Do not use reagents after their expiration date
 - Periodically verify the accuracy and precision of pipets and the correct functioning of the instruments
 - Change gloves often, especially if you suspect they are contaminated
 - Clean workspaces periodically with at least 5% bleach and a decontaminating agent like DNA AWAY
 - Use powder-free gloves
- For SDS product safety information and certificate of analysis, visit bio-rad.com

Protocol

Please read the entire protocol before starting the assay.

Follow the recommended instructions indicated in each iQ-Check Kit insert.

iQ-Check Free DNA Removal Treatment

Activation of the iQ-Check Free DNA Removal Solution

- Rehydrate the freeze-dried reagent G1 in 1 ml of *Legionella* DNA-free distilled or Milli-Q water for 5–10 min at room temperature. Gently mix by inverting the vial. DO NOT VORTEX
- After hydration, transfer G1 (1 ml) to the activation buffer vial (G2, 9 ml). Gently mix by inverting the vial

The solution is now activated and ready to use. You will need 40 µl of the activated solution (G1 and G2) for each sample.

Treatment with the Activated Solution (G1 + G2)

The Aquadien Free DNA Removal Solution can be used as part of the Aquadien DNA Extraction Short Protocol.

- Filter the water sample
- Add the filter in a tube containing 460 µl *Legionella* DNA-free water and 40 µl Free DNA Removal Solution
- Invert the tube up and down for homogenization (do not vortex)
- Incubate at 37°C for 30 min
- Add 500 µl R1 to inactivate Free DNA Removal Solution and for DNA extraction
- Vortex for 10 sec
- Incubate for 15 min at 95°C and 1,300 rpm in a shaking heating block
- Carefully take out the filter by pressing it on the walls of the tube to recover all the solution
- Centrifuge at 900 x g for 3 min
- Place the purification column in a collector vial
- Apply 500 µl of the supernatant on the purification column
- Centrifuge at 6,000 x g for 10 min
- Add 100 µl of R2 solution and throw away the collector vial
- Cover the purification column with a clean collector vial and turn both upside down
- Centrifuge at 1,000 x g for 3 min
- Throw away the purification column; 100 µl of purified DNA is obtained
- Use 5 µl of the extracted DNA for real-time PCR analysis

iQ-Check *Legionella* Protocols

Please refer to the user guides for iQ-Check *Legionella* Kits (catalog #3578102-3578105).

Revision History

Release date	Document number	Change
April 2016	10000058391 Ver A	New document
June 2018	10000058391 Ver B	Addition of iQ-Check <i>Legionella</i> protocol
October 2019	10000058391 Ver C	Addition of iQ-Check <i>Vibrio</i> protocol
October 2021	10000058391 Ver D	Translation of document

BIO-RAD is a trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc. All trademarks used herein are the property of their respective owner.

iQ-Check Free DNA Removal Solution for Food, Water, and Environmental Samples

N° de référence	Description
3594970	iQ-Check Free DNA Removal Solution , 1 flacon (175 mg de poudre lyophilisée) de réactif de traitement de l'ADN libre iQ-Check ; 1 flacon (9 ml) de tampon d'activation 10x iQ-Check

Uniquement pour une utilisation en laboratoire.

Usage prévu

Depuis que la PCR (réaction de polymérisation en chaîne) est devenue la méthode de choix pour les tests de routine, l'un de ses plus grands défis a été la détection potentielle d'ADN issu de cellules mortes. Pour les méthodes iQ-Check, Free DNA Removal Solution (qui peut être facilement intégrée aux flux d'extraction d'ADN iQ-Check et Aquadien) est une solution idéale pour traiter l'ADN libre dans les échantillons d'aliments, d'eau et les échantillons environnementaux avant l'analyse par PCR. Tandis que l'ADN des cellules vivantes et intactes est protégé, l'ADN libre de l'échantillon et l'ADN présent en raison de différents processus industriels sont dégradés.

iQ-Check Free DNA Removal Solution pour les échantillons d'aliments et les échantillons environnementaux enrichis

Principe

La dégradation de l'ADN libre est effectuée par une enzyme de sélection et son tampon spécifique, dans des conditions optimisées. Ce traitement enzymatique garantit que les bouillons enrichis sont dépourvus d'ADN libre avant l'extraction d'ADN. Ensuite, le tampon de lyse iQ-Check, en combinaison avec la lyse thermique, inactive l'enzyme, ce qui permet l'extraction d'ADN des cellules vivantes et intactes. Cette solution enzymatique est aussi efficace que le traitement avec monoazide d'éthidium (EMA) ou monoazide de propidium (PMA), mais elle est beaucoup plus simple à utiliser.

iQ-Check Free DNA Removal Solution est recommandée pour l'analyse des éléments suivants :

- Matrices traitées thermiquement/cuites (par exemple, laits en poudre et sous-composantes).
- Produits traités avec interventions phagiques.
- Échantillons environnementaux soumis à des agents nettoyants et incluant potentiellement des cellules mortes.

iQ-Check Free DNA Removal Solution permet une réduction logarithmique moyenne de 2 à 3 (environ 6 valeurs de cycle de quantification [Cq]) du signal issu de l'ADN libre. Un rapport d'évaluation complet est disponible sur demande.

Composants du kit

Réactif de traitement de l'ADN libre iQ-Check (G1)	1 flacon (175 mg de poudre lyophilisée)
Tampon d'activation 10x iQ-Check (G2)	1 flacon x 9 ml

Durée de conservation et stockage

Après réception, le kit doit être stocké à 2–8 °C. Un kit non ouvert peut être utilisé jusqu'à la date de péremption indiquée sur les étiquettes. La durée de conservation de la solution activée (G1 réhydraté + G2) est de 24 heures à température ambiante, 7 jours à 2–8 °C et 3 mois à -20 °C. Dans le dernier cas et avant de le réutiliser, laisser le flacon se décongeler à température ambiante. Il est recommandé d'aliquoter le réactif activé : 1 ml est nécessaire pour 96 tests, dans le cadre du protocole simplifié d'extraction d'ADN (10 µl* réactif/100 µl échantillon enrichi).

*Pour le flux d'extraction d'ADN iQ-Check *Vibrio*, distribuer 20 µl.

Matériel requis non fourni

Liste non exhaustive.

Matériel

- Tout le matériel de laboratoire habituel
- Micropipette de 1 000 µl
- Agitateur thermique capable de maintenir une température de 37 ± 2 °C (n° de référence 3594995)

Produits

- Eau distillée stérile ou eau Milli-Q
- Embouts filtrants stériles adaptables pour micropipettes de 1 000 µl
- Produits spécifiques pour extraction en plaque Deep Well
 - 1 ml Deep Well Microplate (n° de référence 3594900)
 - X-Pierce Film (n° de référence 3593977, 3600040, États-Unis et Canada)
- Gants non poudrés
- Agent de décontamination tel que DNA AWAY ou RNase AWAY
- Visiter bio-rad.com/iqcheck pour obtenir la liste des kits iQ-Check pour aliments

Précautions

- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire (EN ISO 7218). Porter un équipement de protection approprié, par exemple des gants et une blouse de laboratoire, pour travailler avec des bactéries vivantes potentiellement infectieuses.
- Ce protocole doit être réalisé par un personnel ayant suivi une formation adéquate.
- Tous les matériels potentiellement infectieux doivent être soumis à l'autoclave avant élimination.
- La qualité des résultats dépend du strict respect des bonnes pratiques de laboratoire suivantes, particulièrement en ce qui concerne la PCR :
 - Ne jamais transférer du matériel de laboratoire (pipettes, tubes, etc.) d'un poste de travail à un autre.
 - Toujours utiliser un contrôle positif et un contrôle négatif pour chaque série de réactions d'amplification.
 - Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption.
 - Vérifier périodiquement l'exactitude et la précision des pipettes, ainsi que le fonctionnement correct des instruments.
 - Changer de gants fréquemment, surtout si une contamination est suspectée.
 - Nettoyer les postes de travail périodiquement avec de l'eau de Javel à 5 % (au moins) et un agent de décontamination tel que DNA AWAY.
 - Utiliser des gants non poudrés.
- Il est fortement recommandé de respecter les exigences générales décrites dans la norme EN ISO 22714:2005 (Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences générales et définitions).
- Pour obtenir les informations sur la sécurité du produit (fiche de données de sécurité, FDS) et le certificat d'analyse, visiter **bio-rad.com**

Protocole

Il est recommandé de lire le protocole dans son intégralité avant de commencer le test.

Enrichissement de l'échantillon

Suivre les instructions du guide d'utilisation de chaque kit iQ-Check.

Traitement de l'ADN libre iQ-Check

Activation d'iQ-Check Free DNA Removal Solution

- Réhydrater le lyophilisat G1 dans 1 ml d'eau distillée ou d'eau Milli-Q pendant 5–10 min à température ambiante. Mélanger doucement par retournement du flacon. NE PAS VORTEXER.
- Après hydratation, transférer G1 (1 ml) dans le flacon de tampon d'activation (G2, 9 ml). Mélanger doucement par retournement du flacon.

La solution est désormais activée et prête à l'emploi. 1 ml de la solution activée (G1 et G2) est nécessaire pour effectuer 96 tests avec le protocole simplifié d'extraction d'ADN (10 µl* réactif/100 µl échantillon enrichi).

Traitement avec la solution activée (G1 + G2)

Avant de commencer le test, allumer l'agitateur thermique et le régler sur 37 ± 2 °C.

- Distribuer 10 µl* de solution activée (G1 + G2) dans autant de puits d'une microplaque Deep Well vide qu'il existe d'échantillons à analyser.
- Ajouter 100 µl d'échantillon enrichi décanté dans chaque puits. Éviter les débris de matrice ou les couches grasses.
- Sceller la microplaque Deep Well avec le film X-Pierce.
- Incuber la microplaque scellée dans l'agitateur thermique, SANS agiter, à 37 ± 2 °C pendant 15–30 min.

*Pour le flux d'extraction d'ADN iQ-Check *Vibrio*, distribuer 20 µl.

Protocoles iQ-Check

Poursuivre avec le protocole simplifié d'extraction d'ADN (I ou II) en utilisant les 100 µl d'échantillon enrichi traité dans 100 µl de réactif de lyse, conformément aux recommandations Bio-Rad décrites dans le guide d'utilisation du kit iQ-Check PCR. Veiller à ce que l'agitateur thermique ait atteint 95–100 °C afin d'inactiver de manière adéquate iQ-Check Free DNA Removal Solution.

Validations

iQ-Check Free DNA Removal Solution a été validée pour une large gamme d'applications. Se reporter au guide d'utilisation correspondant à chaque kit iQ-Check PCR pour obtenir des détails spécifiques.

iQ-Check Free DNA Removal Solution pour *Legionella*

Principe

La dégradation de l'ADN libre est effectuée par une enzyme de sélection et son tampon spécifique, dans des conditions optimisées. Ce traitement enzymatique garantit que les échantillons sont dépourvus d'ADN libre avant l'extraction d'ADN. Ensuite, le tampon de lyse iQ-Check, en combinaison avec la lyse thermique, inactive l'enzyme, ce qui permet l'extraction d'ADN des cellules vivantes et intactes.

iQ-Check Free DNA Removal Solution est recommandée pour l'analyse des échantillons environnementaux, dans le contexte d'une détection de *Legionella*. Cette solution permet une réduction logarithmique jusqu'à 2,5 (environ 6 valeurs Cq) du signal issu de l'ADN libre.

Composants du kit

Kit Free DNA Removal Solution (10 x 96 tests)

Réactif de traitement de l'ADN libre iQ-Check (G1)	1 flacon (175 mg de poudre lyophilisée)
Tampon d'activation 10x iQ-Check (G2)	1 flacon x 9 ml

Durée de conservation et stockage

Après réception, le kit doit être stocké à 2–8 °C. Un kit non ouvert peut être utilisé jusqu'à la date de péremption indiquée sur les étiquettes. La durée de conservation de la solution activée (G1 réhydraté + G2) est de 24 heures à température ambiante, 7 jours à 2–8 °C et 3 mois à -20 °C. Dans le dernier cas et avant de le réutiliser, laisser le flacon se décongeler à température ambiante. Il est recommandé d'aliqoter le réactif activé en vue d'une conservation (40 µl sont nécessaires pour chaque échantillon).

Matériel requis non fourni

Liste non exhaustive.

Matériel

- Tout le matériel de laboratoire habituel
- Micropipette de 1 000 µl
- Agitateur thermique capable de maintenir une température de 37 ± 2 °C (n° de référence 3594986)

Produits

- *Legionella* DNA Free Water (n° de référence 12006823)
- Embouts filtrants stériles adaptables pour micropipettes de 1 000 µl
- Tubes de 2 ml pour le protocole court Aquadien
- Gants non poudrés
- Agent de décontamination tel que DNA AWAY ou RNase AWAY

Précautions

- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire (EN ISO 7218). Porter un équipement de protection approprié, par exemple des gants et une blouse de laboratoire, pour travailler avec des bactéries vivantes potentiellement infectieuses.
- Ce protocole doit être réalisé par un personnel ayant suivi une formation adéquate.
- Tous les matériels potentiellement infectieux doivent être soumis à l'autoclave avant élimination.
- La qualité des résultats dépend du strict respect des bonnes pratiques de laboratoire suivantes, particulièrement en ce qui concerne la PCR :
 - Ne jamais transférer du matériel de laboratoire (pipettes, tubes, etc.) d'un poste de travail à un autre.
 - Toujours utiliser un contrôle positif et un contrôle négatif pour chaque série de réactions d'amplification.
 - Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption.
 - Vérifier périodiquement l'exactitude et la précision des pipettes, ainsi que le fonctionnement correct des instruments.
 - Changer de gants fréquemment, surtout si une contamination est suspectée.
 - Nettoyer les postes de travail périodiquement avec de l'eau de Javel à 5 % (au moins) et un agent de décontamination tel que DNA AWAY.
 - Utiliser des gants non poudrés.
- Pour obtenir les informations sur la sécurité du produit (fiche de données de sécurité, FDS) et le certificat d'analyse, visiter **bio-rad.com**

Protocole

Il est recommandé de lire le protocole dans son intégralité avant de commencer le test.

Suivre les instructions de la notice de chaque kit iQ-Check.

Traitement de l'ADN libre iQ-Check

Activation d'iQ-Check Free DNA Removal Solution

- Réhydrater le lyophilisat G1 dans 1 ml d'eau *Legionella* DNA Free Water distillée ou d'eau Milli-Q pendant 5–10 min à température ambiante. Mélanger doucement par retournement du flacon. NE PAS VORTEXER.
- Après hydratation, transférer G1 (1 ml) dans le flacon de tampon d'activation (G2, 9 ml). Mélanger doucement par retournement du flacon.

La solution est désormais activée et prête à l'emploi. 40 µl de la solution activée (G1 et G2) sont nécessaires pour chaque échantillon.

Traitement avec la solution activée (G1 + G2)

Il est possible d'utiliser Aquadien Free DNA Removal Solution dans le cadre du protocole court d'extraction d'ADN Aquadien.

- Filtrer l'échantillon d'eau.
- Ajouter le filtre à un tube contenant 460 µl d'eau *Legionella* DNA Free Water et 40 µl de Free DNA Removal Solution.
- Retourner le tube plusieurs fois pour homogénéiser (ne pas vortexer).
- Incuber à 37 °C pendant 30 minutes.
- Ajouter 500 µl de R1 pour inactiver Free DNA Removal Solution et pour l'extraction d'ADN.
- Vortexer pendant 10 secondes.
- Incuber pendant 15 min à 95 °C et 1 300 rpm dans un bloc de chauffage agitateur.
- Retirer délicatement le filtre et l'essorer le long de la paroi du tube afin de récupérer la totalité de la solution.
- Centrifuger à 900 x g pendant 3 minutes.
- Placer la colonne de purification dans un flacon collecteur.
- Appliquer 500 µl du surnageant sur la colonne de purification.
- Centrifuger à 6 000 x g pendant 10 minutes.
- Ajouter 100 µl de solution R2 et jeter le flacon collecteur.
- Couvrir la colonne de purification avec un flacon collecteur propre et retourner l'ensemble.
- Centrifuger à 1 000 x g pendant 3 minutes.

- Jeter la colonne de purification ; 100 µl d'ADN purifié sont obtenus.
- Utiliser 5 µl de l'ADN extrait pour l'analyse de PCR en temps réel.

Protocoles iQ-Check *Legionella*

Se reporter au guide d'utilisation des kits iQ-Check *Legionella* (n° de référence 3578102-3578105).

Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Avril 2016	10000058391 Ver A	Nouveau document
Juin 2018	10000058391 Ver B	Ajout du protocole iQ-Check <i>Legionella</i>
Octobre 2019	10000058391 Ver C	Ajout du protocole iQ-Check <i>Vibrio</i>
Octobre 2021	10000058391 Ver D	Traduction du document

BIO-RAD est une marque déposée de Bio-Rad Laboratories, Inc. Toutes les marques déposées utilisées dans ce document appartiennent à leur propriétaire respectif.

iQ-Check Free DNA Removal Solution for Food, Water, and Environmental Samples

Katalog-Nr.	Beschreibung
3594970	iQ-Check Free DNA Removal Solution , 1 Fläschchen (175 mg lyophilisiertes Pulver) iQ-Check Reagenz zur Entfernung von freier DNA; 1 Fläschchen (9 ml) iQ-Check 10x Aktivierungspuffer

Nur für die Verwendung im Labor.

Verwendungszweck

Die PCR ist heute die Methode der Wahl für Routinetests. Zu den größten Schwierigkeiten zählen dabei die potenzielle Verunreinigung mit DNA aus toten Zellen und eine dadurch bedingten Verfälschung der Nachweisreaktion. Die Free DNA Removal Solution (Lösung zur Entfernung von freier DNA) lässt sich ohne Weiteres in den Arbeitsablauf zur DNA-Extraktion bei iQ-Check- und Aquadien-Methoden integrieren und ermöglicht es auf ideale Weise, freie DNA aus Lebensmittel-, Wasser- und Umweltproben vor der PCR-Analyse zu entfernen. Dabei wird freie DNA aus der Probe und jegliche DNA, die aufgrund verschiedener industrieller Prozesse vorhanden ist, abgebaut, während die DNA in intakten und lebenden Zellen geschützt bleibt.

iQ-Check Free DNA Removal Solution für angereicherte Lebensmittel- und Umweltproben

Prinzip

Der Abbau freier DNA erfolgt durch ein ausgewähltes Enzym und seinen spezifischen Puffer unter optimierten Bedingungen. Diese enzymatische Behandlung stellt sicher, dass die angereicherten Probenlösungen vor der DNA-Extraktion keine freie DNA mehr enthalten. Anschließend wird das Enzym mithilfe des iQ-Check Lysepuffer durch thermale Lyse inaktiviert, was die Extraktion von DNA aus intakten und lebenden Zellen ermöglicht. Diese enzymatische Lösung wirkt genauso gut wie eine Behandlung mit Ethidiummonoazid (EMA) oder Propidiummonoazid (PMA), jedoch auf viel einfachere Weise.

iQ-Check Free DNA Removal Solution wird empfohlen für die Analyse von:

- Wärmebehandelten/gekochten Matrices (z. B. Milchpulver und Unterkomponenten)
- Mit Phageninterventionen behandelten Produkten
- Umweltproben, die Reinigungsmitteln ausgesetzt waren und möglicherweise tote Zellen enthalten

Die Verwendung der iQ-Check Free DNA Removal Solution führt zu einer durchschnittlichen Reduzierung des Signals durch freie DNA um 2–3 Log (Quantifizierungszyklus[Cq]-Wert von ca. 6). Auf Anfrage ist ein vollständiger Leistungsbericht erhältlich.

Kitkomponenten

iQ-Check-Reagenz zur Entfernung von freier DNA (G1)	1 Fläschchen (175 mg lyophilisiertes Pulver)
iQ-Check 10x Aktivierungspuffer (G2)	1 Fläschchen x 9 ml

Haltbarkeit und Lagerung

Nach dem Erhalt muss das Kit bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Ungeöffnet kann das Kit bis zu dem auf den Etiketten angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.

Die Haltbarkeit der aktivierten Lösung (rehydratisiertes G1 + G2) beträgt 24 Stunden bei Raumtemperatur, 7 Tage bei 2–8 °C und 3 Monate bei -20 °C. Das Fläschchen vor der Verwendung auftauen und Raumtemperatur annehmen lassen. Es wird empfohlen, das aktivierte Reagenz zu aliquotieren: Bei Durchführung des einfachen DNA-Extraktionsprotokolls wird für 96 Tests 1 ml benötigt (10 µl* Reagenz/100 µl angereicherte Probe).

*Für den Arbeitsablauf zur DNA-Extraktion von *Vibrio* mithilfe von iQ-Check 20 µl verwenden.

Zusätzlich benötigtes Material

Diese Liste ist nicht vollständig.

Geräte

- Alle üblichen Laborgeräte
- Mikropipette für 1000 µl
- Auf 37 ± 2 °C einstellbarer Thermoschüttler (Katalog-Nr. 3594995)

Zubehör

- Steriles destilliertes Wasser oder Milli-Q Wasser
- Sterile Filterspitzen, passend für 1000 µl
- Speziell für die Extraktion in einer Deep Well Platte
 - 1 ml Deep Well Microplate (Katalog-Nr. 3594900)
 - X-Pierce Film (Katalog-Nr. 3593977, 3600040 in den USA und Kanada)
- Ungepuderte Handschuhe
- Dekontaminationsmittel wie DNA AWAY oder RNase AWAY
- Auf bio-rad.com/igcheck ist eine Liste von iQ-Check-Kits zur Verwendung mit Lebensmittelproben angegeben

Vorsichtsmaßnahmen

- Es sind die Richtlinien der guten Laborpraxis zu beachten (EN ISO 7218). Bei der Arbeit mit potenziell infektiösen lebenden Bakterien sollte angemessene Schutzkleidung wie Handschuhe und Laborkittel getragen werden.
- Dieses Protokoll muss von entsprechend geschultem Personal durchgeführt werden
- Alle potenziell infektiösen Materialien sollten vor dem Entsorgen autoklaviert werden.
- Die Ergebnisqualität hängt von der strikten Einhaltung der folgenden guten Laborpraxis ab. In Bezug auf die PCR ist vor allem Folgendes zu beachten:
 - Die Laborgerätschaften (Pipetten, Röhrchen usw.) dürfen nicht an mehreren Arbeitsplätzen verwendet werden.
 - Es ist unerlässlich, bei jeder Serie von Amplifikationsreaktionen eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle zu verwenden.
 - Die Reagenzien nach Ablauf ihres Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
 - Die Genauigkeit und Präzision der Pipetten sowie die ordnungsgemäße Funktion der Geräte muss regelmäßig überprüft werden.
 - Handschuhe häufig wechseln, vor allem dann, wenn vermutet wird, dass sie kontaminiert sein könnten.
 - Die Arbeitsplätze regelmäßig mit mindestens 5%iger Bleichlösung und einem anderen Dekontaminationsmittel, z. B. DNA AWAY, reinigen.
 - Puderfreie Einweghandschuhe verwenden.
- Es wird dringend empfohlen, die in der Norm EN ISO 22714:2005-02 „Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln – Allgemeine Anforderungen und Begriffe“ beschriebenen Anforderungen einzuhalten.
- Das Sicherheitsdatenblatt (SDS) und das Analysezertifikat für das Produkt sind auf **bio-rad.com** erhältlich.

Protokoll

Bitte lesen Sie das gesamte Protokoll, bevor Sie mit der Durchführung des Assays beginnen.

Probenanreicherung

Es sind die Anwendungsempfehlungen in der Gebrauchsanleitung jedes iQ-Check-Kits zu befolgen.

Behandlung zur Entfernung freier DNA mit dem iQ-Check Kit

Aktivierung der iQ-Check Free DNA Removal Solution

- Das gefriergetrocknete Reagenz G1 für 5–10 min bei Raumtemperatur in 1 ml destilliertem oder Milli-Q Wasser rehydratisieren. Durch Umdrehen des Fläschchens vorsichtig mischen. NICHT VORTEXEN
- Nach der Hydratisierung G1 (1 ml) in das Fläschchen mit Aktivierungspuffer (G2, 9 ml) überführen. Durch Umdrehen des Fläschchens vorsichtig mischen.

Die Lösung ist nun aktiviert und anwendungsbereit. Es wird 1 ml der aktivierten Lösung (G1 und G2) benötigt, um 96 Tests mit dem Easy DNA-Extraktionsprotokoll durchzuführen (10 µl* Reagenz/100 µl angereicherte Probe).

Behandlung mit der aktivierten Lösung (G1 + G2)

Vor Beginn des Tests den Thermoschüttler einschalten und auf 37 ± 2 °C einstellen.

- 10 µl* der aktivierten Lösung (G1 + G2) in so viele Wells einer leeren Deep Well Mikrotiterplatte geben, wie zu analysierende Proben vorhanden sind.
- In jedes Well 100 µl dekantierte angereicherte Probe geben. Zelltrümmer oder Fettschichten vermeiden.
- Die Deep Well Mikrotiterplatte mit der X-Pierce Versiegelungsfolie abdecken.
- Die abgedeckte Deep Well Mikrotiterplatte im Thermoschüttler OHNE Schütteln für 15–30 min bei 37 ± 2 °C inkubieren.

*Für den Arbeitsablauf zur DNA-Extraktion von *Vibrio* mithilfe von iQ-Check 20 µl verwenden.

iQ-Check-Protokolle

Mit einem der Easy DNA-Extraktionsprotokolle (I oder II) fortfahren und 100 µl der behandelten angereicherten Probe in 100 µl Lysereagenz nach den Empfehlungen von Bio-Rad in der Gebrauchsanleitung des iQ-Check PCR-Kits verwenden. Für eine vollständige Inaktivierung der iQ-Check Free DNA Removal Solution muss sichergestellt sein, dass der Thermoschüttler eine Temperatur von 95–100 °C erreicht hat,

Validierungen

Die iQ-Check Free DNA Removal Solution wurde für zahlreiche Anwendungen validiert. Einzelheiten sind der Gebrauchsanleitung des jeweiligen iQ-Check PCR-Kits zu entnehmen.

iQ-Check Free DNA Removal Solution für *Legionella*

Prinzip

Der Abbau freier DNA erfolgt durch ein ausgewähltes Enzym und seinen spezifischen Puffer unter optimierten Bedingungen. Diese enzymatische Behandlung stellt sicher, dass die Proben vor der DNA-Extraktion keine freie DNA mehr enthalten. Anschließend wird das Enzym mithilfe des iQ-Check Lysepuffer durch thermale Lyse inaktiviert, was die Extraktion von DNA aus intakten und lebenden Zellen ermöglicht.

Die iQ-Check Free DNA Removal Solution wird zur Behandlung von Umweltproben vor der Analyse auf *Legionella* empfohlen. Die Verwendung der iQ-Check Free DNA Removal Solution führt zu einer Reduzierung des Signals durch freie DNA um bis zu 2,5 Log (Cq-Wert ca. 6).

Kitkomponenten

Free DNA Removal Solution Kit (Kit mit einer Lösung für die Entfernung von freier DNA) (10 x 96 Tests)

iQ-Check-Reagenz zur Entfernung von freier DNA (G1)	1 Fläschchen (175 mg lyophilisiertes Pulver)
iQ-Check 10x Aktivierungspuffer (G2)	1 Fläschchen x 9 ml

Haltbarkeit und Lagerung

Nach dem Erhalt muss das Kit bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Ungeöffnet kann das Kit bis zu dem auf den Etiketten angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.

Die Haltbarkeit der aktivierten Lösung (rehydratisiertes G1 + G2) beträgt 24 Stunden bei Raumtemperatur, 7 Tage bei 2–8 °C und 3 Monate bei -20 °C. Das Fläschchen vor der Verwendung auftauen und Raumtemperatur annehmen lassen. Es wird empfohlen, das aktivierte Reagenz für die Lagerung zu aliquotieren (für jede Probe werden 40 µl benötigt).

Zusätzlich benötigtes Material

Diese Liste ist nicht vollständig.

Geräte

- Alle üblichen Laborgeräte
- Mikropipette für 1000 µl
- Auf 37 ± 2 °C einstellbarer Thermoschüttler (Katalog-Nr. 3594986)

Zubehör

- *Legionella*-DNA-freies Wasser (Katalog-Nr. 12006823)
- Sterile Filterspitzen, passend für 1000 µl
- 2 ml Röhrchen für Aquadien-Kurzprotokoll
- Ungepuderte Handschuhe
- Dekontaminationsmittel wie DNA AWAY oder RNase AWAY

Vorsichtsmaßnahmen

- Es sind die Richtlinien der guten Laborpraxis zu beachten (EN ISO 7218). Bei der Arbeit mit potenziell infektiösen lebenden Bakterien sollte angemessene Schutzkleidung wie Handschuhe und Laborkittel getragen werden.
- Dieses Protokoll muss von entsprechend geschultem Personal durchgeführt werden
- Alle potenziell infektiösen Materialien sollten vor dem Entsorgen autoklaviert werden.

- Die Ergebnisqualität hängt von der strikten Einhaltung der folgenden guten Laborpraxis ab. In Bezug auf die PCR ist vor allem Folgendes zu beachten:
 - Die Laborgerätschaften (Pipetten, Röhrchen usw.) dürfen nicht an mehreren Arbeitsplätzen verwendet werden.
 - Es ist unerlässlich, bei jeder Serie von Amplifikationsreaktionen eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle zu verwenden.
 - Die Reagenzien nach Ablauf ihres Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
 - Die Genauigkeit und Präzision der Pipetten sowie die ordnungsgemäße Funktion der Geräte muss regelmäßig überprüft werden.
 - Handschuhe häufig wechseln, vor allem dann, wenn vermutet wird, dass sie kontaminiert sein könnten.
 - Die Arbeitsplätze regelmäßig mit mindestens 5%iger Bleichelösung und einem anderen Dekontaminationsmittel, z. B. DNA AWAY, reinigen.
 - Puderfreie Einweghandschuhe verwenden.
- Das Sicherheitsdatenblatt (SDS) und das Analysezertifikat für das Produkt sind auf **bio-rad.com** erhältlich.

Protokoll

Bitte lesen Sie das gesamte Protokoll, bevor Sie mit der Durchführung des Assays beginnen.

Es sind die Anwendungsempfehlungen in der Gebrauchsanleitung jedes iQ-Check-Kits zu befolgen.

Behandlung zur Entfernung freier DNA mit dem iQ-Check Kit

Aktivierung der iQ-Check Free DNA Removal Solution

- Das gefriergetrocknete Reagenz G1 für 5–10 min bei Raumtemperatur in 1 ml destilliertem *Legionella*-DNA-freiem Wasser oder Milli-Q Wasser rehydratisieren. Durch Umdrehen des Fläschchens vorsichtig mischen. NICHT VORTEXEN
- Nach der Hydratisierung G1 (1 ml) in das Fläschchen mit Aktivierungspuffer (G2, 9 ml) überführen. Durch Umdrehen des Fläschchens vorsichtig mischen.

Die Lösung ist nun aktiviert und anwendungsbereit. Für jede Probe werden 40 µl der aktivierten Lösung (G1 und G2) benötigt.

Behandlung mit der aktivierten Lösung (G1 + G2)

Für das Aquadien-Kurzprotokoll zur DNA-Extraktion kann die Aquadien Free DNA Removal Solution (Aquadien-Lösung zur Entfernung von freier DNA) verwendet werden.

- Die Wasserprobe filtern.
- Den Filter in ein Röhrchen mit 460 µl *Legionella* DNA-freiem Wasser und 40 µl Free DNA Removal Solution geben.
- Das Röhrchen zum Homogenisieren umdrehen (nicht vortexen).
- 30 min bei 37 °C inkubieren.
- Zum Inaktivieren der Free DNA Removal Solution und für die DNA-Extraktion 500 µl R1 zugeben.
- 10 s vortexen.
- In einem Heizblock bei 95 °C und unter Schütteln bei 1300 U/min 15 min inkubieren.
- Den Filter vorsichtig herausnehmen und dabei die darin enthaltene Lösung so vollständig wie möglich an den Wänden des Röhrchens ausdrücken.
- Bei 900 x g 3 min zentrifugieren.
- Die Aufreinigungssäule in ein Sammelgefäß geben.
- 500 µl des Überstands auf die Aufreinigungssäule auftragen.
- Bei 6.000 x g 10 min zentrifugieren.
- 100 µl R2-Lösung zugeben und das Sammelgefäß entsorgen.
- Ein sauberes Sammelgefäß auf die Aufreinigungssäule aufsetzen und beide zusammen umdrehen.
- Bei 1.000 x g 3 min zentrifugieren.
- Die Aufreinigungssäule entsorgen. Es wurden 100 µl aufgereinigte DNA erhalten.
- 5 µl der extrahierten DNA für die Analyse per Real Time-PCR verwenden.

iQ-Check-Protokolle für *Legionella*

Es sind die Gebrauchsanleitungen für iQ-Check *Legionella* Kits (Katalog-Nr. 3578102-3578105) zu beachten.

Revisionshistorie

Freigabedatum	Dokumentnummer	Änderung
April 2016	10000058391 Ver A	Neues Dokument
Juni 2018	10000058391 Ver B	Hinzufügung des iQ-Check <i>Legionella</i> Protokolls
Oktober 2019	10000058391 Ver C	Hinzufügung des iQ-Check <i>Vibrio</i> Protokolls
Oktober 2021	10000058391 Ver D	Übersetzung des Dokuments

BIO-RAD ist eine Marke von Bio-Rad Laboratories, Inc. Alle hierin verwendeten Marken sind Eigentum der jeweiligen Firmen.

iQ-Check Free DNA Removal Solution for Food, Water, and Environmental Samples

Numero catalogo Descrizione

3594970 **iQ-Check Free DNA Removal Solution**, 1 flaconcino (175 mg di polvere liofilizzata) di reagente di rimozione del DNA libero iQ-Check; 1 flaconcino (9 ml) di buffer di attivazione iQ-Check 10x

Esclusivamente per uso in laboratorio.

Uso previsto

Da quando la PCR è diventata il metodo di elezione per gli esami di routine, una delle sue sfide maggiori si è rivelata il rilevamento potenziale del DNA da cellule morte. Per i metodi iQ-Check, Free DNA Removal Solution, può essere facilmente integrato con i flussi di lavoro di estrazione del DNA iQ-Check e Aquadien e fornisce un modo ideale per rimuovere il DNA libero dai campioni di alimenti, acqua e ambientali per l'analisi PCR. Mentre il DNA presente nelle cellule intatte e vitali è protetto, il DNA libero del campione, e qualsiasi altro presente dovuto a diversi processi industriali, sarà deteriorato.

iQ-Check Free DNA Removal Solution per campioni alimentari e ambientali arricchiti

Principio

Il deterioramento del DNA libero viene eseguito da un enzima selezionato e dal suo buffer specifico in condizioni ottimizzate. Questo trattamento enzimatico garantisce che i brodi arricchiti siano privi di DNA libero prima dell'estrazione del DNA. In seguito, il buffer di lisi iQ-Check in combinazione con la lisi termica disattiva l'enzima, permettendo l'estrazione di DNA da cellule intatte e viventi. Questa soluzione enzimatica raggiunge gli stessi risultati dei trattamenti con etidio monoazide (EMA) o propidio monoazide (PMA) ma in modo più semplice e intuitivo.

iQ-Check Free DNA Removal Solution è consigliato per l'analisi di:

- Matrici riscaldate/cotte (ad esempio, latte in polvere e sottocomponenti)
- Prodotti trattati con l'intervento di fagi
- Campioni ambientali sottoposti a detersivi e con una potenziale presenza di cellule morte

L'utilizzo della iQ-Check Free DNA Removal Solution porta a una riduzione media di 2-3 log (circa 6 valori del ciclo di quantificazione [Cq]) del segnale derivante dal DNA libero. Su richiesta è disponibile un rapporto completo delle prestazioni.

Componenti del kit

Reagente di rimozione del DNA libero iQ-Check (G1)	1 flaconcino (175 mg di polvere liofilizzata)
Buffer di attivazione iQ-Check 10x (G2)	1 flaconcino x 9 ml

Durata e conservazione

Una volta ricevuto, il kit deve essere conservato a 2-8 °C. Un kit sigillato può essere usato fino alla data di scadenza riportata sulle etichette. La durata della soluzione attivata (G1 + G2 reidratati) è di 24 ore a temperatura ambiente, 7 giorni a 2-8 °C e 3 mesi a -20 °C. Prima del riutilizzo, lasciare che il flaconcino si scongeli a temperatura ambiente. Si consiglia di aliquotare il reagente attivato: È necessario 1 ml per 96 test durante l'esecuzione del protocollo di estrazione del DNA Easy (10 µl* reagente/100 µl di campione arricchito).

*Per il flusso di lavoro dell'estrazione del DNA iQ-Check per *Vibrio*, dispensare 20 µl.

Materiali richiesti non in dotazione

Il presente elenco non è esaustivo.

Apparecchiatura

- Tutta la normale apparecchiatura di laboratorio
- Micropipetta da 1.000 µl
- Termoagitatore in grado di mantenere 37 ± 2 °C (numero catalogo 3594995)

Materiali in dotazione

- Acqua distillata sterile o acqua Milli-Q
- Puntali sterili con filtro, adattabili a 1.000 µl
- Specifici per l'estrazione in una piastra a pozzetti profondi
 - 1 ml Deep Well microplate (numero catalogo 3594900)
 - X-Pierce Film (numero catalogo 3593977, 3600040 in USA e Canada)
- Guanti senza polvere
- Agente decontaminante come DNA AWAY o RNase AWAY
- Visitare bio-rad.com/iqcheck per un elenco dei kit per alimenti iQ-Check

Precauzioni

- Rispettare le buone pratiche di laboratorio (EN ISO 7218). Indossare protezioni adeguate, come guanti e camici da laboratorio, quando si manipolano batteri vivi potenzialmente infettivi
- Questo protocollo deve essere eseguito da personale adeguatamente addestrato
- Tutti i materiali potenzialmente infetti devono essere collocati in autoclave prima dello smaltimento
- La qualità dei risultati si basa sulla rigorosa osservanza delle seguenti buone pratiche di laboratorio, soprattutto in materia di PCR:
 - Non spostare le apparecchiature da laboratorio (pipette, provette, ecc.) da una postazione di lavoro all'altra
 - È essenziale utilizzare un controllo positivo e un controllo negativo per ogni serie di reazioni di amplificazione
 - Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza
 - Verificare periodicamente l'accuratezza e la precisione delle pipette, nonché il corretto funzionamento degli strumenti
 - Cambiare i guanti di frequente, in particolare se si sospetta la presenza di contaminazione
 - Pulire regolarmente gli spazi di lavoro con almeno il 5% di candeggina e un agente decontaminante come DNA AWAY
 - Usare guanti senza polvere
- Si consiglia vivamente di osservare i requisiti generali illustrati nella norma EN ISO 22714:2005, "Microbiologia di alimenti e mangimi per animali – Reazione a catena di polimerizzazione (PCR) per la ricerca dei microrganismi patogeni degli alimenti – Requisiti generali e definizioni"
- Per informazioni sulla sicurezza del prodotto (schede dati di sicurezza) e il certificato di analisi, visitare bio-rad.com

Protocollo

Leggere l'intero protocollo prima di avviare il dosaggio.

Arricchimento del campione

Seguire le istruzioni consigliate indicate in ciascuna guida per l'utente del Kit iQ-Check.

Trattamento per la rimozione del DNA libero iQ-Check

Attivazione della iQ-Check Free DNA Removal Solution

- Reidratare il reagente liofilizzato G1 in 1 ml di acqua distillata o Milli-Q per 5–10 minuti a temperatura ambiente. Miscelare delicatamente capovolgendo il flaconcino. NON MISCELARE NEL VORTEX
- Dopo l'idratazione, trasferire G1 (1 ml) nel flaconcino del buffer di attivazione (G2, 9 ml). Miscelare delicatamente capovolgendo il flaconcino

La soluzione è ora attivata e pronta all'uso. Sarà necessario 1 ml della soluzione attivata (G1 e G2) per eseguire 96 test utilizzando il protocollo di estrazione del DNA semplice (10 µl* reagente/100 µl campione arricchito).

Trattamento con soluzione attivata (G1 + G2)

Prima di iniziare il test, accendere il termoaggitatore e impostarlo su 37 ± 2 °C.

- Dispensare 10 µl* di soluzione attivata (G1 + G2) in tanti pozzetti di una micropiastra Deep Well vuota quanti sono i campioni da analizzare
- Aggiungere 100 µl di campione arricchito decantato per pozzetto. Evitare detriti nelle matrici o strati spessi
- Sigillare la micropiastra Deep Well con pellicola sigillante forata a X
- Incubare la micropiastra Deep Well sigillata nel termoaggitatore SENZA agitare a 37 ± 2 °C per 15–30 minuti

*Per il flusso di lavoro dell'estrazione del DNA iQ-Check per *Vibrio*, dispensare 20 µl.

Protocolli iQ-Check

Proseguire con i protocolli di estrazione del DNA easy (I o II) usando i 100 µl di campione arricchito trattato in 100 µl di reagente di lisi seguendo le raccomandazioni di Bio-Rad nella guida per l'utente del Kit PCR di iQ-Check. Assicurarsi che il termoaggitatore abbia raggiunto una temperatura di 95–100 °C per disattivare correttamente la soluzione di rimozione del DNA libero iQ-Check.

Validazioni

iQ-Check Free DNA Removal Solution è stata convalidata per un'ampia gamma di applicazioni. Fare riferimento alla guida per l'utente per ciascun Kit PCR di iQ-Check per informazioni dettagliate.

iQ-Check Free DNA Removal Solution for *Legionella*

Principio

Il deterioramento del DNA libero viene eseguito da un enzima selezionato e dal suo buffer specifico in condizioni ottimizzate. Questo trattamento enzimatico garantisce che i campioni siano privi di DNA libero prima dell'estrazione del DNA. In seguito, il buffer di lisi iQ-Check in combinazione con la lisi termica disattiva l'enzima, permettendo l'estrazione di DNA da cellule intatte e viventi.

iQ-Check Free DNA Removal Solution è consigliata per l'analisi di campioni ambientali per l'analisi della *Legionella*. L'utilizzo della iQ-Check Free DNA Removal Solution porta a una riduzione fino a 2,5 log (circa 6 valori del Cq) del segnale derivante dal DNA libero.

Componente del kit

Kit della soluzione di rimozione del DNA libero (10 x 96 test)

Reagente di rimozione del DNA libero iQ-Check (G1)	1 flaconcino (175 mg di polvere liofilizzata)
Buffer di attivazione iQ-Check 10x (G2)	1 flaconcino x 9 ml

Durata e conservazione

Una volta ricevuto, il kit deve essere conservato a 2-8 °C. Un kit sigillato può essere usato fino alla data di scadenza riportata sulle etichette. La durata della soluzione attivata (G1 + G2 reidratati) è di 24 ore a temperatura ambiente, 7 giorni a 2-8 °C e 3 mesi a -20 °C. Prima del riutilizzo, lasciare che il flaconcino si scongeli a temperatura ambiente. Si consiglia di aliquotare il reagente attivato per la conservazione (sono necessari 40 µl per ciascun campione).

Materiali richiesti non in dotazione

Il presente elenco non è esaustivo.

Apparecchiatura

- Tutta la normale apparecchiatura di laboratorio
- Micropipetta da 1.000 µl
- Termoagitatore in grado di mantenere 37 ± 2 °C (numero catalogo 3594986)

Materiali in dotazione

- *Legionella* DNA Free Water (numero catalogo 12006823)
- Puntali sterili con filtro, adattabili a 1.000 µl
- Provette da 2 ml per protocollo Aquadien breve
- Guanti senza polvere
- Agente decontaminante come DNA AWAY o RNase AWAY

Precauzioni

- Rispettare le buone pratiche di laboratorio (EN ISO 7218). Indossare protezioni adeguate, come guanti e camici da laboratorio, quando si manipolano batteri vivi potenzialmente infettivi
- Questo protocollo deve essere eseguito da personale adeguatamente addestrato
- Tutti i materiali potenzialmente infetti devono essere collocati in autoclave prima dello smaltimento
- La qualità dei risultati si basa sulla rigorosa osservanza delle seguenti buone pratiche di laboratorio, soprattutto in materia di PCR:
 - Non spostare le apparecchiature da laboratorio (pipette, provette, ecc.) da una postazione di lavoro all'altra
 - È essenziale utilizzare un controllo positivo e un controllo negativo per ogni serie di reazioni di amplificazione
 - Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza
 - Verificare periodicamente l'accuratezza e la precisione delle pipette, nonché il corretto funzionamento degli strumenti
 - Cambiare i guanti di frequente, in particolare se si sospetta la presenza di contaminazione
 - Pulire regolarmente gli spazi di lavoro con almeno il 5% di candeggina e un agente decontaminante come DNA AWAY
 - Usare guanti senza polvere
- Per informazioni sulla sicurezza del prodotto (schede dati di sicurezza) e il certificato di analisi, visitare **bio-rad.com**

Protocollo

Leggere l'intero protocollo prima di avviare il dosaggio.

Seguire le istruzioni consigliate indicate in ciascun inserto del Kit iQ-Check.

Trattamento per la rimozione del DNA libero iQ-Check

Attivazione della iQ-Check Free DNA Removal Solution

- Reidrattare il reagente liofilizzato G1 in 1 ml di acqua distillata o Milli-Q con DNA libero di *Legionella* per 5–10 minuti a temperatura ambiente. Miscelare delicatamente capovolgendo il flaconcino. **NON MISCELARE NEL VORTEX**
- Dopo l'idratazione, trasferire G1 (1 ml) nel flaconcino del buffer di attivazione (G2, 9 ml). Miscelare delicatamente capovolgendo il flaconcino

La soluzione è ora attivata e pronta all'uso. Saranno necessari 40 µl di soluzione attivata (G1 e G2) per ciascun campione.

Trattamento con soluzione attivata (G1 + G2)

Aquadien Free DNA Removal Solution può essere usata come parte del protocollo di estrazione del DNA breve Aquadien.

- Filtrare il campione di acqua
- Aggiungere il filtro in una provetta contenente 460 µl di acqua con DNA libero di *Legionella* e 40 µl di soluzione di rimozione del DNA libero
- Capovolgere alcune volte la provetta per omogeneizzare (non miscelare nel vortex)
- Incubare a 37 °C per 30 minuti
- Aggiungere 500 µl di R1 per disattivare la soluzione di rimozione del DNA libero e per l'estrazione del DNA
- Miscelare nel vortex per 10 secondi
- Incubare per 15 minuti a 95 °C e 1.300 giri/min in un blocco termico in agitazione
- Estrarre con attenzione il filtro premendolo contro le pareti della provetta per recuperare tutta la soluzione
- Centrifugare a 900 x g per 3 minuti
- Posizionare la colonna di purificazione in un flaconcino di raccolta
- Applicare 500 µl del surnatante sulla colonna di purificazione
- Centrifugare a 6.000 x g per 10 minuti
- Aggiungere 100 µl di soluzione R2 e gettare il flaconcino di raccolta
- Coprire la colonna di purificazione con un flaconcino di raccolta pulito e capovolgere entrambi
- Centrifugare a 1.000 x g per 3 minuti

- Gettare la colonna di purificazione; si ottengono 100 µl di DNA purificato
- Utilizzare 5 µl del DNA estratto per l'analisi PCR in tempo reale

Protocolli iQ-Check per *Legionella*

Fare riferimento alle guide per l'utente per i Kit iQ-Check per *Legionella* (numeri catalogo 3578102-3578105).

Cronologia delle revisioni

Data di pubblicazione	Numero documento	Modifica
Aprile 2016	10000058391 Ver A	Nuovo documento
Giugno 2018	10000058391 Ver B	Aggiunta del protocollo iQ-Check per <i>Legionella</i>
Ottobre 2019	10000058391 Ver C	Aggiunta del protocollo iQ-Check per <i>Vibrio</i>
Ottobre 2021	10000058391 Ver D	Traduzione del documento

BIO-RAD è un marchio registrato di Bio-Rad Laboratories, Inc. Tutti i marchi registrati qui utilizzati sono di proprietà del rispettivo proprietario.



iQ-Check Free DNA Removal Solution for Food, Water, and Environmental Samples

Nº catálogo	Descrição
3594970	iQ-Check Free DNA Removal Solution , 1 ampola (175 mg de pó liofilizado) reagente de remoção de DNA livre iQ-Check; 1 ampola (9 ml) tampão de ativação 10x iQ-Check

Somente para uso em laboratório.

Uso previsto

Visto que o PCR se tornou o método de escolha para testes de rotina, um de seus maiores desafios tem sido a detecção potencial de DNA de células mortas. Para os métodos iQ-Check, o Free DNA Removal Solution, que pode ser facilmente integrado aos fluxos de trabalho de extração de DNA iQ-Check e Aquadien, fornece uma maneira ideal para remoção do DNA livre das amostras de alimento, água e ambiente antes da análise do PCR. Enquanto o DNA em células intactas e vivas estiver protegido, o DNA livre da amostra e qualquer um que esteja presente devido aos diferentes processos industriais, serão degradados.

iQ-Check Free DNA Removal Solution para amostras enriquecidas de alimentos e ambiente

Princípio

A degradação do DNA livre é feita por uma enzima selecionada e seu tampão específico em condições otimizadas. Esse tratamento enzimático garante que os caldos enriquecidos sejam desprovidos de DNA livre antes da extração do DNA. Em seguida, o tampão de lise iQ-Check, em combinação com o lise térmico inativa a enzima, permitindo a extração do DNA das células intactas e vivas. Esta solução enzimática funciona tão bem quanto os tratamentos com monoazida de etídio (EMA) ou monoazida de propídio (PMA), mas de uma maneira muito mais fácil e simples.

O iQ-Check Free DNA Removal Solution é recomendado para análise de:

- Matrizes processadas a quente/cozidas (por exemplo, leite em pó e subcomponentes)
- Produtos tratados com intervenções por fagos
- Amostras ambientais submetidas a agentes de limpeza e potencialmente portadoras de células mortas

O uso do iQ-Check Free DNA Removal Solution resulta em uma redução média de 2 a 3 log (aproximadamente valores de 6 ciclos de quantificação [Cq]) no sinal de DNA livre. Um relatório completo do desempenho está disponível mediante solicitação.

Componentes do Kit

Reagente de remoção de DNA livre iQ-Check (G1)	1 ampola (175 mg de pó liofilizado)
Tampão de ativação 10x iQ-Check (G2)	1 ampola x 9 ml

Prazo de validade e Armazenamento

Uma vez recebido, o kit deve ser armazenado a 2–8°C. Um kit não aberto pode ser usado até o prazo de validade indicado nos rótulos.

A vida útil da solução ativada (G1 + G2 reidratado) é de 24 horas à temperatura ambiente, sete dias a 2–8°C, e três meses a -20°C. Antes da reutilização, deixe a ampola descongelar à temperatura ambiente. Recomenda-se uma alíquota do reagente ativado: é necessário 1 ml para 96 testes ao realizar o protocolo de extração fácil de DNA (10 µl* de reagente/100 µl de amostra enriquecida).

*Para o fluxo de trabalho de extração de DNA *Vibrio* iQ-Check, dispense 20 µl.

Materiais necessários não fornecidos

Essa lista não é exaustiva.

Equipamento

- Todo o equipamento comum de laboratório
- Micropipeta de 1.000 µl
- Agitador térmico capaz de manter 37 ± 2°C (nº do catálogo 3594995)

Suprimentos

- Água destilada estéril ou água Milli-Q
- Ponteiras com filtro estéreis, adaptáveis a 1.000 µl
- Específico para extração em uma placa de poços
 - 1 ml Deep Well Microplate (nº do catálogo 3594900)
 - X-Pierce Film (nº do catálogo 3593977, 3600040 nos EUA e Canadá)
- Luvas sem talco
- Agente descontaminante, como o DNA AWAY ou o RNase AWAY
- Visite bio-rad.com/iqcheck para obter uma lista dos Kits de Alimentos iQ-Check

Precauções

- Respeite as Boas Práticas de Laboratório (EN ISO 7218). Proteção adequada, como luvas e jalecos, deve ser usada ao trabalhar com bactérias vivas potencialmente infecciosas
- Este protocolo deve ser realizado por pessoal adequadamente treinado
- Todos os materiais potencialmente infecciosos devem passar por autoclavagem antes do descarte
- A qualidade dos resultados depende da estrita conformidade com as seguintes boas práticas laboratoriais, especialmente em relação ao PCR:
 - Os equipamentos de laboratório (pipetas, tubos, etc.) não devem circular entre postos de trabalho
 - É essencial utilizar um controle positivo e um controle negativo para cada série de reações de amplificação
 - Não utilize reagentes após a expiração de suas datas de validade
 - Verifique periodicamente a exatidão e precisão das pipetas e o funcionamento correto dos instrumentos
 - Troque frequentemente de luvas, especialmente se suspeitar que estão contaminadas
 - Limpe periodicamente os locais de trabalho com alvejante 5% e um agente descontaminante como o DNA AWAY
 - Use luvas sem talco
- Recomenda-se fortemente seguir dos requisitos gerais descritos na norma EN ISO 22714:2005, "Microbiologia de alimentos para animais e para animais - reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de patógenos de origem alimentar - Requisitos e definições gerais"
- Para informações de segurança do produto SDS e certificado de análise, visite bio-rad.com

Protocolo

Leia o protocolo inteiro antes de iniciar o teste.

Enriquecimento da amostra

Siga as instruções recomendadas indicadas em cada guia do usuário do Kit iQ-Check.

Tratamento de remoção de DNA livre iQ-Check

Ativação do iQ-Check Free DNA Removal Solution

- Hidrate novamente o reagente liofilizado G1 em 1 ml de água destinada ou água Milli-Q durante 5–10 min à temperatura ambiente. Misture suavemente ao inverter a ampola. **NÃO AGITE**
 - Após a hidratação, transfira o G1 (1 ml) para a ampola do tampão de ativação (G2, 9 ml). Misture suavemente ao inverter a ampola
- A solução agora está ativada e pronta para utilização. Você precisará de 1 ml de solução ativada (G1 e G2) ao realizar 96 testes usando o Protocolo de extração fácil de DNA (10 µl* de reagente/100 µl de amostra enriquecida).

Tratamento com a solução ativada (G1 + G2)

Antes de iniciar o teste, ligue o agitador térmico e ajuste-o para uma temperatura de 37 ± 2°C.

- Dispense 10 µl* de solução ativada (G1 + G2) em tantos poços de uma microplaca Deep Well quantas amostras a serem analisadas
- Adicione 100 µl da amostra enriquecida decantada por poço. Evite resíduos da matriz ou camadas de gordura
- Vede a microplaca Deep Well com o filme de vedação X-Pierce
- Incube a microplaca Deep Well selada no agitador térmico SEM agitar a 37 ± 2°C por 15–30 min

*Para o fluxo de trabalho de extração de DNA *Vibrio* iQ-Check, dispense 20 µl.

Protocolos iQ-Check

Prossiga com os Protocolos de extração fácil de DNA (I ou II) usando 100 µl de amostra enriquecida tratada em 100 µl de reagente de lise, seguindo as recomendações da Bio-Rad que constam no guia do usuário do Kit de PCR iQ-Check. Certifique-se de que o agitador térmico atingiu 95–100°C para inativar adequadamente o iQ-Check Free DNA Removal Solution.

Validações

O iQ-Check Free DNA Removal Solution foi validado para uma ampla gama de aplicações. Consulte o guia de usuário para cada Kit de PCR iQ-Check para obter detalhes específicos.

iQ-Check Free DNA Removal Solution for *Legionella*

Princípio

A degradação do DNA livre é feita por uma enzima selecionada e seu tampão específico em condições otimizadas. Este tratamento enzimático garante que essas amostras sejam desprovidas de DNA livre antes da extração do DNA. Em seguida, o tampão de lise iQ-Check, em combinação com o lise térmico inativa a enzima, permitindo a extração do DNA das células intactas e vivas.

o iQ-Check Free DNA Removal Solution é recomendada para análise de amostras ambientais para teste de *Legionella*. O uso do iQ-Check Free DNA Removal Solution resulta em uma redução de até 2.5 log (aproximadamente valores de 6 Cq) no sinal de DNA livre.

Componente do kit

Kit de solução de remoção de DNA livre (96 testes 10x)

Reagente de remoção de DNA livre iQ-Check (G1)	1 ampola (175 mg de pó liofilizado)
Tampão de ativação 10x iQ-Check (G2)	1 ampola x 9 ml

Prazo de validade e Armazenamento

Uma vez recebido, o kit deve ser armazenado a 2–8°C. Um kit não aberto pode ser usado até o prazo de validade indicado nos rótulos.

A vida útil da solução ativada (G1 + G2 reidratado) é de 24 horas à temperatura ambiente, sete dias a 2–8°C, e três meses a -20°C. Antes da reutilização, deixe a ampola descongelar à temperatura ambiente. Recomenda-se uma alíquota do reagente ativado para armazenamento (40 µl são necessários para cada amostra).

Materiais necessários não fornecidos

Essa lista não é exaustiva.

Equipamento

- Todo o equipamento comum de laboratório
- Micropipeta de 1.000 µl
- Agitador térmico capaz de manter 37 ± 2°C (nº do catálogo 3594986)

Suprimentos

- *Legionella* DNA Free Water (nº do catálogo 12006823)
- Ponteiras com filtro estéreis, adaptáveis a 1.000 µl
- Tubos de 2 ml para protocolo curto de Aquadien
- Luvas sem talco
- Agente descontaminante, como o DNA AWAY ou o RNase AWAY

Precauções

- Respeite as Boas Práticas de Laboratório (EN ISO 7218). Proteção adequada, como luvas e jalecos, deve ser usada ao trabalhar com bactérias vivas potencialmente infecciosas
- Este protocolo deve ser realizado por pessoal adequadamente treinado
- Todos os materiais potencialmente infecciosos devem passar por autoclavagem antes do descarte
- A qualidade dos resultados depende da estrita conformidade com as seguintes boas práticas laboratoriais, especialmente em relação ao PCR:
 - Os equipamentos de laboratório (pipetas, tubos, etc.) não devem circular entre postos de trabalho
 - É essencial utilizar um controle positivo e um controle negativo para cada série de reações de amplificação
 - Não utilize reagentes após a expiração de suas datas de validade
 - Verifique periodicamente a exatidão e precisão das pipetas e o funcionamento correto dos instrumentos
 - Troque frequentemente de luvas, especialmente se suspeitar que estão contaminadas
 - Limpe periodicamente os locais de trabalho com alvejante 5% e um agente descontaminante como o DNA AWAY
 - Use luvas sem talco
- Para informações de segurança do produto SDS e certificado de análise, visite **bio-rad.com**

Protocolo

Leia o protocolo inteiro antes de iniciar o teste.

Siga as instruções recomendadas indicadas em cada encarte do Kit iQ-Check.

Tratamento de remoção de DNA livre iQ-Check

Ativação do iQ-Check Free DNA Removal Solution

- Hidrate novamente o reagente liofilizado G1 em 1 ml de água destilada livre de DNA de *Legionella* ou água Milli-Q durante 5–10 min à temperatura ambiente. Misture suavemente ao inverter a ampola. NÃO AGITE
- Após a hidratação, transfira o G1 (1 ml) para a ampola do tampão de ativação (G2, 9 ml). Misture suavemente ao inverter a ampola. A solução agora está ativada e pronta para utilização. Você precisará de 40 µl de solução ativada (G1 e G2) para cada amostra.

Tratamento com a solução ativada (G1 + G2)

A Aquadien Free DNA Removal Solution pode ser usada como parte do Protocolo curto de extração de DNA de Aquadien.

- Filtre a amostra de água
- Adicione o filtro em um tubo contendo 460 µl de água livre de DNA de *Legionella* e 40 µl de solução de remoção de DNA livre
- Inverta o tubo para cima e para baixo para homogeneização (não agite)
- Incube a 37°C por 30 min.
- Adicione 500 µl R1 para inativar a solução de remoção de DNA livre e para extração de DNA
- Agite por 10 seg.
- Incube por 15 min a 95°C e 1.300 rpm em um bloco de aquecimento para agitação
- Retire o filtro com cuidado, pressionando-o contra as paredes do tubo para recuperar toda a solução
- Centrifugue a 900 x g por 3 min.
- Coloque uma coluna de purificação em uma ampola coletora
- Aplique 500 µl de sobrenadante em uma coluna de purificação
- Centrifugue a 6.000 x g por 10 min.
- Adicione 100 µl de solução R2 e jogue fora a ampola coletora
- Cubra a coluna de purificação com uma ampola coletora limpa e vire ambas de cabeça para baixo
- Centrifugue a 1.000 x g por 3 min.
- Jogue fora a coluna de purificação. São obtidos 100 µl de DNA purificado
- Use 5 µl de DNA extraído para análise de PCR em tempo real

Protocolos de *Legionella* iQ-Check

Consulte os guias de usuário para os Kits *Legionella* iQ-Check (nº dos catálogos 3578102-3578105).

Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Abril de 2016	10000058391 Ver A	Novo documento
Junho de 2018	10000058391 Ver B	Adição do protocolo <i>Legionella</i> iQ-Check
Outubro de 2019	10000058391 Ver C	Adição do protocolo <i>Vibrio</i> iQ-Check
Outubro de 2021	10000058391 Ver D	Tradução do documento

BIO-RAD é uma marca comercial da Bio-Rad Laboratories, Inc. Todas as marcas comerciais usadas neste documento são de propriedade de seus respectivos proprietários.



iQ-Check Free DNA Removal Solution for Food, Water, and Environmental Samples

Referencia # Descripción

3594970 **iQ-Check Free DNA Removal Solution**, 1 frasco (175 mg de polvo liofilizado) iQ-Check reactivo de extracción de ADN libre; 1 frasco (9 ml) iQ-Check 10x tampón de activación

Sólo para uso en laboratorio.

Uso previsto

Desde que la PCR se convirtió en el método elegido para las pruebas de rutina, uno de sus principales retos ha sido la posible detección de ADN de células muertas. Para los métodos iQ-Check, el Free DNA Removal Solution, puede integrarse fácilmente con los flujos de trabajo de iQ-Check y Aquadien para la extracción de ADN proporcionando una forma ideal de extraer el ADN libre de los alimentos, agua y muestras ambientales antes del análisis de PCR. Mientras que el ADN de las células intactas y vivas está protegido, el ADN libre de la muestra, y el que esté presente debido a diferentes procesos industriales, se degradará.

iQ-Check Free DNA Removal Solution para muestras alimenticias y ambientales enriquecidas

Principio

La degradación del ADN libre se realiza mediante una enzima selecta y su tampón específico en condiciones optimizadas. Este tratamiento enzimático garantiza que los caldos de enriquecimientos estén ausentes de ADN libre antes de la extracción de ADN. A continuación, el tampón de lisis iQ-Check, en combinación con la lisis térmica, inactiva la enzima, permitiendo la extracción de ADN de células intactas y vivas. Esta solución enzimática funciona tan bien como los tratamientos con monoazida de etidio (EMA) o monoazida de propidio (PMA), pero de forma mucho más fácil y sencilla.

iQ-Check Free DNA Removal Solution se recomienda para el análisis de:

- Matrices procesadas por calor/cocidas (por ejemplo, leche en polvo y subcomponentes)
- Productos tratados con intervenciones de fagos
- Muestras ambientales sometidas a agentes de limpieza y potencialmente portadoras de células muertas

El uso de iQ-Check Free DNA Removal Solution da lugar a una reducción media de 2-3 log (aproximadamente 6 valores de ciclos de cuantificación [Cq]) en la señal del ADN libre. Se puede solicitar un informe completo de resultados.

Componentes del kit

Reactivo de extracción de ADN libre iQ-Check (G1)	1 vial (175 mg de polvo liofilizado)
Tampón de activación iQ-Check 10x (G2)	1 vial x 9 ml

Vida útil y almacenamiento

Una vez recibido, el kit debe ser almacenado a 2 - 8 °C. Un kit sin abrir puede utilizarse hasta la fecha de caducidad indicada en las etiquetas. La vida útil de la solución activada (G1 +G2 rehidratados) es de 24 horas a temperatura ambiente, 7 días a 2-8 °C y 3 meses a -20 °C. Antes de reutilizarlo, deje que el vial se descongele a temperatura ambiente. Se recomienda alicuotar el reactivo activado: Se necesita 1 ml para 96 pruebas cuando se realiza el protocolo de extracción fácil de ADN (10 µl* de reactivo/100 µl de muestra enriquecida).

*Para el flujo de trabajo de extracción de ADN de iQ-Check *Vibrio*, dispensar 20 µl.

Materiales necesarios, pero no suministrados

Esta lista no es exhaustiva.

Equipos

- Todo el equipo habitual del laboratorio
- Micropipeta de 1000 µl
- Termoagitador capaz de mantener 37 ± 2 °C (referencia #3594995)

Fungibles

- Agua destilada estéril o agua Milli-Q
- Puntas con filtro estériles, adaptables a 1.000 µl
- Materiales específicos para la extracción en una placa de pocillos profundos
 - 1 ml Deep Well Microplate (referencia #3594900)
 - X-Pierce Film (referencia #3593977, 3600040 en EE.UU. y Canadá)
- Guantes sin polvo
- Agente descontaminante, como DNA AWAY o RNase AWAY
- Visite bio-rad.com/iqcheck para ver una lista de kits de alimentación iQ-Check

Precauciones

- Deben respetarse las buenas prácticas de laboratorio (EN ISO 7218). Usar protección adecuada, como guantes y batas de laboratorio, cuando se trabaja con bacterias vivas potencialmente infecciosas
- Este protocolo debe ser realizado por personal adecuadamente capacitado
- Todo el material potencialmente infeccioso debe ser esterilizado en autoclave antes de su eliminación
- La calidad de los resultados depende del estricto cumplimiento de las siguientes Buenas Prácticas de Laboratorio, especialmente en lo que respecta a la PCR:
 - El material de laboratorio (pipetas, tubos, etc.) no debe circular de una estación de trabajo a otra
 - Es esencial utilizar un control positivo y un control negativo para cada serie de reacciones de amplificación
 - No utilice los reactivos después de su fecha de caducidad
 - Verifique periódicamente la exactitud y precisión de las pipetas y el correcto funcionamiento de los instrumentos
 - Cámbiese los guantes a menudo, especialmente si sospecha que están contaminados
 - Limpie periódicamente los espacios de trabajo con al menos un 5 % de lejía y un agente descontaminante como DNA AWAY
 - Utilizar guantes sin polvo
- Se recomienda encarecidamente seguir los requisitos generales descritos en la norma EN ISO 22714:2005 "Microbiología de los alimentos y piensos - Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos transmitidos por los alimentos - Requisitos generales y definiciones"
- Visite bio-rad.com para obtener información de seguridad del producto (SDS) y certificados de análisis

Protocolo

Por favor, lea todo el protocolo antes de comenzar el ensayo.

Enriquecimiento de la muestra

Siga las instrucciones recomendadas indicadas en cada guía de usuario del kit iQ-Check.

Tratamiento de extracción de ADN libre iQ-Check

Activación de iQ-Check Free DNA Removal Solution

- Rehidratar el reactivo liofilizado G1 con 1 ml de agua destilada o Milli-Q durante 5-10 min a temperatura ambiente. Mezclar suavemente invirtiendo el vial. NO AGITAR CON AGITADOR VORTEX
 - Tras la hidratación, transferir G1 (1 ml) al vial de tampón de activación (G2, 9 ml). Mezclar suavemente invirtiendo el vial
- La solución ya está activada y lista para ser utilizada. Necesitará 1 ml de la solución activada (G1 y G2) para realizar 96 pruebas utilizando el protocolo de extracción fácil de ADN (10 µl* de reactivo/100 µl de muestra enriquecida).

Tratamiento con la solución activada (G1 + G2)

Antes de comenzar la prueba, encienda el termoagitador y ajústelo a 37 ± 2 °C.

- Dispensar 10 µl* de solución activada (G1 + G2) en tantos pocillos de una microplaca Deep Well como número de muestras que se analizarán
- Añadir 100 µl de muestra enriquecida decantada por pocillo. Evitar los residuos de la matriz o capas de grasa
- Sellar la microplaca Deep Well con la película de sellado X-Pierce
- Incubar la microplaca Deep Well sellada en el termoagitador SIN agitación a 37 ± 2 °C durante 15-30 min

*Para el flujo de trabajo de extracción de ADN de iQ-Check *Vibrio*, dispensar 20 µl.

Protocolos iQ-Check

Proceda a los protocolos de extracción fácil de ADN (I o II) utilizando los 100 µl de muestra enriquecida tratada en 100 µl de reactivo de lisis siguiendo las recomendaciones de Bio-Rad de la guía del usuario del kit de PCR iQ-Check. Asegúrese de que el termoagitador haya alcanzado los 95-100 °C para inactivar correctamente la solución de extracción de ADN libre iQ-Check.

Validaciones

iQ-Check Free DNA Removal Solution ha sido validada para una amplia gama de aplicaciones. Consulte la guía del usuario de cada kit de PCR iQ-Check para obtener detalles específicos.

iQ-Check Free DNA Removal Solution for *Legionella*

Principio

La degradación del ADN libre se realiza mediante una enzima selecta y su tampón específico en condiciones optimizadas. Este tratamiento enzimático garantiza que las muestras estén ausentes de ADN libre antes de la extracción de ADN. A continuación, el tampón de lisis iQ-Check, en combinación con la lisis térmica, inactiva la enzima, permitiendo la extracción de ADN de células intactas y vivas.

iQ-Check Free DNA Removal Solution se recomienda para el análisis de muestras ambientales para la prueba de *Legionella*. El uso de iQ-Check Free DNA Removal Solution reduce hasta 2,5 log (aproximadamente 6 valores Cq) en la señal del ADN libre.

Componentes del kit

Kit de solución de extracción de ADN libre (10 x 96 pruebas)

Reactivo de extracción de ADN libre iQ-Check (G1)	1 vial (175 mg de polvo liofilizado)
Tampón de activación iQ-Check 10x (G2)	1 vial x 9 ml

Vida útil y almacenamiento

Una vez recibido, el kit debe ser almacenado a 2 - 8 °C. Un kit sin abrir puede utilizarse hasta la fecha de caducidad indicada en las etiquetas. La vida útil de la solución activada (G1 +G2 rehidratados) es de 24 horas a temperatura ambiente, 7 días a 2-8 °C y 3 meses a -20 °C. Antes de reutilizarlo, deje que el vial se descongele a temperatura ambiente. Se recomienda alicuotar el reactivo activado para su almacenamiento (se necesitan 40 µl para cada muestra).

Materiales necesarios, pero no suministrados

Esta lista no es exhaustiva.

Equipos

- Todo el equipo habitual del laboratorio
- Micropipeta de 1000 µl
- Termoagitador capaz de mantener 37 ± 2 °C (referencia #3594986)

Fungibles

- *Legionella* DNA Free Water (referencia #12006823)
- Puntas con filtro estériles, adaptables a 1.000 µl
- Tubos de 2 ml para el protocolo corto Aquadien
- Guantes sin polvo
- Agente descontaminante, como DNA AWAY o RNase AWAY

Precauciones

- Deben respetarse las buenas prácticas de laboratorio (EN ISO 7218). Usar protección adecuada, como guantes y batas de laboratorio, cuando se trabaja con bacterias vivas potencialmente infecciosas
- Este protocolo debe ser realizado por personal adecuadamente capacitado
- Todo el material potencialmente infeccioso debe ser esterilizado en autoclave antes de su eliminación
- La calidad de los resultados depende del estricto cumplimiento de las siguientes Buenas Prácticas de Laboratorio, especialmente en lo que respecta a la PCR:
 - El material de laboratorio (pipetas, tubos, etc.) no debe circular de una estación de trabajo a otra
 - Es esencial utilizar un control positivo y un control negativo para cada serie de reacciones de amplificación
 - No utilice los reactivos después de su fecha de caducidad
 - Verifique periódicamente la exactitud y precisión de las pipetas y el correcto funcionamiento de los instrumentos
 - Cámbiese los guantes a menudo, especialmente si sospecha que están contaminados
 - Limpie periódicamente los espacios de trabajo con al menos un 5 % de lejía y un agente descontaminante como DNA AWAY
 - Utilice guantes sin polvo
- Visite bio-rad.com para obtener información de seguridad del producto (SDS) y certificados de análisis

Protocolo

Por favor, lea todo el protocolo antes de comenzar el ensayo.

Siga las instrucciones recomendadas indicadas en la guía de usuario de cada kit iQ-Check.

Tratamiento de extracción de ADN libre iQ-Check

Activación de iQ-Check Free DNA Removal Solution

- Rehidratar el reactivo liofilizado G1 en 1 ml de agua destilada o Milli-Q sin ADN de *Legionella* durante 5-10 min a temperatura ambiente. Mezclar suavemente invirtiendo el vial. NO AGITAR CON AGITADOR VORTEX
 - Tras la hidratación, transferir G1 (1 ml) al vial de tampón de activación (G2, 9 ml). Mezclar suavemente invirtiendo el vial
- La solución ya está activada y lista para ser utilizada. Necesitará 40 µl de la solución activada (G1 y G2) para cada muestra.

Tratamiento con la solución activada (G1 + G2)

Aquadien Free DNA Removal Solution puede utilizarse como parte del protocolo Aquadien corto para la extracción de ADN

- Filtrar la muestra de agua
- Añadir el filtro en un tubo que contenga 460 µl de agua libre de ADN de *Legionella* y 40 µl de solución de extracción de ADN libre
- Invertir el tubo hacia arriba y hacia abajo para la homogeneización (no hacer vórtices)
- Incubar a 37 °C durante 30 min
- Añadir 500 µl de R1 para inactivar la solución de extracción de ADN libre y para la extracción de ADN
- Someter a agitación vorticial durante 10 segundos
- Incubar durante 15 min a 95 °C y 1.300 rpm en un bloque de calentamiento con agitación
- Sacar con cuidado el filtro presionándolo contra las paredes del tubo para recuperar toda la solución
- Centrifugar a 900 x g durante 3 minutos
- Colocar la columna de purificación en un vial colector
- Agregar 500 µl del sobrenadante en la columna de purificación
- Centrifugar a 6.000 x g durante 10 min
- Añadir 100 µl de solución R2 y tirar el vial colector
- Cubrir la columna de purificación con un vial colector limpio y poner ambos boca abajo
- Centrifugar a 1.000 x g durante 3 min

- Tirar la columna de purificación; se obtienen 100 µl de ADN purificado
- Utilizar 5 µl del ADN extraído para el análisis de la PCR en tiempo real

Protocolos de iQ-Check para la *Legionella*

Please refer to the user guides for iQ-Check *Legionella* Kits (catalog #3578102-3578105).

Historial de revisiones

Fecha de publicación	N.º de documento	Cambio
Abril de 2016	10000058391 Ver A	Documento nuevo
Junio de 2018	10000058391 Ver B	Adición al protocolo iQ-Check para la <i>Legionella</i>
Octubre de 2019	10000058391 Ver C	Adición al protocolo iQ-Check para <i>Vibrio</i>
Octubre de 2021	10000058391 Ver D	Traducción del documento

BIO-RAD es una marca registrada de Bio-Rad Laboratories, Inc. Todas las marcas comerciales aquí indicadas son propiedad de sus respectivos propietarios.

iQ-Check Free DNA Removal Solution for Food, Water, and Environmental Samples

目录 #	描述
3594970	iQ-Check Free DNA Removal Solution , 1 小瓶 (175 mg 冻干粉) iQ-Check Free DNA Removal Reagent; 1 小瓶 (9 ml) iQ-Check 10 倍激活缓冲液

仅供实验室使用。

预期用途

自从 PCR 成为常规检测的首选方法以来，主要挑战之一是可能从死亡细胞中检测到 DNA。对于 iQ-Check 方法，Free DNA Removal Solution 可轻松结合 iQ-Check 和 Aquadien DNA 提取方法流程，为在 PCR 分析之前从食物、水和环境样品中去除游离 DNA 提供了一种理想的解决方案。虽然在完整的活细胞中，DNA 受到保护，但样品中的游离 DNA 以及由于不同的工业处理过程而存在的 DNA 都将被降解。

适用于增菌食品和环境样品的 iQ-Check Free DNA Removal Solution

原理

在优化的条件下，通过某种选定的酶及其特定的缓冲液进行游离 DNA 降解。这种酶处理确保了在提取 DNA 之前，增菌液里没有游离 DNA。然后，iQ-Check 裂解缓冲液结合热裂解使酶失活，允许从完整的活细胞中提取 DNA。这种酶溶液的效果与叠氮溴化乙锭 (EMA) 或叠氮溴化丙锭 (PMA) 的效果一样好，但方法更简单。

建议使用 iQ-Check Free DNA Removal Solution 来分析：

- 热处理/烹饪的基质（例如奶粉及其亚成分）
- 用噬菌体预处理的产品
- 使用清洁剂并可能携带死亡细胞的环境样本

使用 iQ-Check Free DNA Removal Solution，可将游离 DNA 信号平均减少 2-3 个对数（约 6 个量化周期 [Cq] 值）。完整的性能报告可根据要求提供。

成分列表

iQ-Check Free DNA Removal Reagent (G1)	1 小瓶 (175 mg 冻干粉)
iQ-Check 10 倍激活缓冲液 (G2)	1 小瓶 x 9 ml

保质期和储存

请将该试剂盒置于 2-8° C 条件下储存。未开封的试剂盒在有效期内均可使用。

活化溶液（再水合 G1 +G2）在室温下的保质期为 24 小时，在 2-8°C 下的保质期为 7 天，在 -20°C 下的保质期为 3 个月。在重新使用之前，请将小瓶解冻，并升至室温。建议等分活化试剂：当操作简单的 DNA 提取方案（10 µl* 试剂/100 µl 增菌样品）时，96 次测试需要 1 ml。

*对于 iQ-Check *Vibrio* DNA 提取流程，需要分装 20 µl。

未提供所需材料

这份清单并非详尽无遗。

仪器

BIO-RAD 是 Bio-Rad Laboratories, Inc. 的商标。此处使用的所有商标均为其各自所有者的财产。

- 所有常用的实验室仪器
- 1,000 µl 微量移液器
- 能够保持 37±2°C 的加热振荡混合仪（产品目录号 3594995）

试剂和耗材

- 无菌蒸馏水或 Milli-Q 水
- 无菌带滤芯枪头，适用于 1,000 µl
- 专用于在深孔板内提取
 - 1 ml Deep Well Microplate（产品目录号 3594900）
 - X-Pierce Film（美国和加拿大的产品目录号 3593977、3600040）
- 无粉手套
- DNA AWAY 或 RNase AWAY 等去除污染试剂
- 请访问 bio-rad.com/igcheck，了解 iQ-Check 食品试剂盒列表

预防措施

- 遵守良好实验室规范 (EN ISO 7218)。在处理具有潜在传染性的活细菌时，应穿戴适当的防护装置，例如手套和实验室外套
- 该方案必须由经过充分培训的人员执行
- 所有具有潜在传染性的材料在处置前都应进行高压灭菌
- 结果的质量取决于严格遵守以下良好实验室规范，尤其是关于 PCR 的规范：
 - 实验室仪器（移液管、试管等）不得从一个工作区传送到另一个工作区
 - 对于每个系列的扩增反应，务必使用阳性对照及阴性对照
 - 试剂过期后请勿使用
 - 定期验证移液器的准确度和精密度，以及确保仪器的正常功能
 - 经常更换手套，尤其是当您怀疑它们被污染时
 - 定期用至少 5% 的漂白剂和去除污染试剂（例如 DNA AWAY）清洁工作场所
 - 使用无粉手套
- 强烈建议遵守标准 EN ISO 22714:2005（食品和动物饲料微生物学 — 用于检测食源性病原体的聚合酶链反应 (PCR) — 一般要求和定义）中描述的一般要求
- 有关 SDS 产品安全信息和分析证书，请访问 bio-rad.com

操作方案

开始检测前，请阅读整个操作方案。

样本增菌

遵循每个 iQ-Check 试剂盒用户指南中的建议说明。

iQ-Check Free DNA Removal 处理

激活 iQ-Check Free DNA Removal Solution

- 在室温下，将冻干试剂 G1 在 1 ml 蒸馏水或 Milli-Q 水中再水合 5-10 分钟。通过倒置小瓶轻轻混合。请勿使用涡旋振荡
 - 水合后，将 G1 (1 ml) 转移至活化缓冲液小瓶 (G2, 9 ml)。通过倒置小瓶轻轻混合
- 溶液现已激活并可以使用。您将需要 1 ml 活化溶液 (G1 和 G2) 来使用简易 DNA 提取方案 (10 µl* 试剂/100 µl 增菌样品) 进行 96 次测试。

使用活化溶液 (G1 + G2) 处理

开始测试前，打开加热振荡混合仪并将其设置为 37±2°C。

- 将 10 µl* 的活化溶液 (G1 + G2) 分配到与待分析样品一样多的空的深孔微板孔中
- 每孔加入 100 µl 增菌样品。避免食品基质碎片或脂肪层
- 使用 X-Pierce 密封膜密封深孔微板
- 将密封的 Deep Well Microplate 放在加热振荡混合仪中，在 37±2°C 的温度下培养 15-30 分钟，请勿晃动

*对于 iQ-Check *Vibrio* DNA 提取流程，需要分装 20 µl。

iQ-Check 方案

按照 Bio-Rad 在 iQ-Check PCR 试剂盒用户指南中的建议，使用 100 µl 裂解试剂中的 100 µl 处理过的增菌样品进行简易 DNA 提取方案 (I 或 II)。确保加热振荡混合仪已经达到 95-100° C，以适当地使 iQ-Check Free DNA Removal Solution。

验证

iQ-Check Free DNA Removal Solution 已经过广泛应用的验证。有关具体详细信息，请参考每种 iQ-Check PCR 试剂盒的用户指南。

适用于 *Legionella* 的 iQ-Check Free DNA Removal Solution

原理

在优化的条件下，通过某种选定的酶及其特定的缓冲液进行游离 DNA 降解。这种酶处理确保了在提取 DNA 之前，样品中没有游离 DNA。然后，iQ-Check 裂解缓冲液结合热裂解使酶失活，允许从完整的活细胞中提取 DNA。

对于 *Legionella* 测试，建议使用 iQ-Check Free DNA Removal Solution 来分析环境样品。使用 iQ-Check Free DNA Removal Solution，可将游离 DNA 信号平均减少 2.5 个对数（约 6 个 Cq 值）。

试剂盒成分

Free DNA Removal Solution Kit (10 x 96 次测试)

iQ-Check Free DNA Removal Reagent (G1)	1 小瓶 (175 mg 冻干粉)
iQ-Check 10 倍激活缓冲液 (G2)	1 小瓶 x 9 ml

保质期和储存

请将该试剂盒置于 2-8° C 条件下储存。未开封的试剂盒在有效期内均可使用。

活化溶液（再水合 G1 +G2）在室温下的保质期为 24 小时，在 2-8°C 下的保质期为 7 天，在 -20°C 下的保质期为 3 个月。在重新使用之前，请将小瓶解冻，并升至室温。建议将活化试剂等分储存（每个样品需要 40 µl）。

未提供所需材料

这份清单并非详尽无遗。

仪器

- 所有常用的实验室仪器
- 1,000 µl 微量移液器
- 能够保持 37±2°C 的加热振荡混合仪（产品目录号 3594986）

试剂和耗材

- *Legionella* DNA Free Water（产品目录号 12006823）
- 无菌带滤芯枪头，适用于 1,000 µl
- 适用于 Aquadien 简单方案的 2 ml 试管
- 无粉手套
- DNA AWAY 或 RNase AWAY 等去除污染试剂

预防措施

- 遵守良好实验室规范 (EN ISO 7218)。在处理具有潜在传染性的活细菌时，应穿戴适当的防护装置，例如手套和实验室外套
- 该方案必须由经过充分培训的人员执行
- 所有具有潜在传染性的材料在处置前都应进行高压灭菌

- 结果的质量取决于严格遵守以下良好实验室规范，尤其是关于 PCR 的规范：
 - 实验室仪器（移液管、试管等）不得从一个工作区传送到另一个工作区
 - 对于每个系列的扩增反应，务必使用阳性对照及阴性对照
 - 试剂过期后请勿使用
 - 定期验证移液器的准确度和精密密度，以及确保仪器的正常功能
 - 经常更换手套，尤其是当您怀疑它们被污染时
 - 定期用至少 5% 的漂白剂和去除污染试剂（例如 DNA AWAY）清洁工作场所
 - 使用无粉手套
- 有关 SDS 产品安全信息和分析证书，请访问 bio-rad.com

操作方案

开始检测前，请阅读整个操作方案。

遵循每个 iQ-Check 试剂盒说明书中的建议说明。

iQ-Check Free DNA Removal 处理

激活 iQ-Check Free DNA Removal Solution

- 在室温下，将冻干试剂 G1 在 1 ml 不含 *Legionella* DNA 的蒸馏水或 Milli-Q 水中再水合 5-10 分钟。通过倒置小瓶轻轻混合。请勿使用涡旋振荡
- 水合后，将 G1 (1 ml) 转移至活化缓冲液小瓶 (G2, 9 ml)。通过倒置小瓶轻轻混合溶液现已激活并可以使用。每个样品需要 40 µl 活化溶液 (G1 和 G2)。

使用活化溶液 (G1 + G2) 处理

Aquadien Free DNA Removal Solution 可用作 Aquadien DNA 提取简单方案的一部分。

- 过滤水样
- 将过滤器加入含有 460 µl 无 *Legionella* DNA 的水和 40 µl Free DNA Removal Solution 的试管中
- 倒置试管，使其均匀化（请勿使用涡旋振荡）
- 在 37°C 的温度下培养 30 分钟
- 加入 500 µl R1 来灭活 Free DNA Removal Solution 并提取 DNA
- 涡旋振荡 10 秒
- 在摇动加热块中，以 95°C 的温度和 1300 rpm 的转速培养 15 分钟
- 将过滤膜压在管壁上，小心取出过滤器，以回收所有溶液
- 以 900×g 离心 3 分钟
- 将纯化柱放入收集瓶中
- 将 500 µl 上清液涂在纯化柱上
- 以 6000×g 离心 10 分钟
- 加入 100 µl R2 溶液，扔掉收集瓶
- 用干净的收集瓶盖住纯化柱，并将两者倒置
- 用 1000×g 离心 3 分钟
- 扔掉纯化柱；获得 100 µl 纯化的 DNA
- 使用 5 µl 提取的 DNA 进行实时 PCR 分析

iQ-Check Legionella 方案

请参考 iQ-Check *Legionella* 试剂盒的用户指南（产品目录号 3578102-3578105）。

修订记录

发布日期	文件编号	变更
2016 年 4 月	10000058391 Ver A	新文件
2018 年 6 月	10000058391 Ver B	增加了 iQ-Check <i>Legionella</i> 方案
2019 年 10 月	10000058391 Ver C	增加了 iQ-Check <i>Vibrio</i> 方案
2021 年 10 月	10000058391 Ver D	文档翻译

BIO-RAD 是 Bio-Rad Laboratories, Inc. 的商标。此处使用的所有商标均为其各自所有者的财产。