



INSTITUT FÜR ANGEWANDTE LABORANALYSEN GMBH

QuickGEN Sample Preparation Centrifugation

Mikrobielle DNA Extraktion aus Getränkeproben
durch Zentrifugation

Microbial DNA extraction from beverages by centrifugation



REF: Q002

Version 01/20

GEN-IAL GmbH
Tel: 0049 2241 2522980
Fax: 0049 2241 2522989
info@gen-ial.de
www.gen-ial.de

QuickGEN Sample Preparation Centrifugation

1. Verwendungszweck

Schnelle und zuverlässige Extraktion von Bakterien- und Hefe DNA aus Getränken (Bier, Rotwein) mit und ohne Voranreicherung durch Zentrifugation

2. Packungsinhalt

Das Kit enthält, je nach Aufarbeitungsprotokoll, Reagenzien für 50 - 100 Extraktionen:

1 x QuickGEN buffer

1 x Washing solution

3. Zusätzlich erforderliches Material

3.1. Geräte

- Zentrifuge
- Pipetten
- "Vortex"

3.2. Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

- für Hefe DNA-Extraktion: Lyticase (Sigma L2524), **in PCR-Kits mit lyophilisierten PCR-Streifen ist die Lyticase bereits im PCR-tube vorgelegt (s. Handbuch PCR-Kit)**
- safe-lock Reaktionsgefäße 1,5 – 2,0 mL
- passende, sterile Filterspitzen
- Einweghandschuhe

4. Vorsichtsmaßnahmen

Grundsätzlich vorsichtiger Umgang mit Chemikalien. Nicht einatmen oder verschlucken. Haut- und Augenkontakt vermeiden.

5. Lagerung

Alle Reagenzien bei Raumtemperatur 15 – 30 °C lagern.

6. Anzeichen für Reagenzienverfall

Bei korrekter Handhabung keine bekannt.

7. Vorbereitungen

Lyticase Lösung herstellen:

5 U / μ L in Lyticasepuffer (50 % 1 x TE + 50 % Glycerol, pH-Wert 7,5 – 8,0)

Nach Herstellung bei -20 °C lagern.

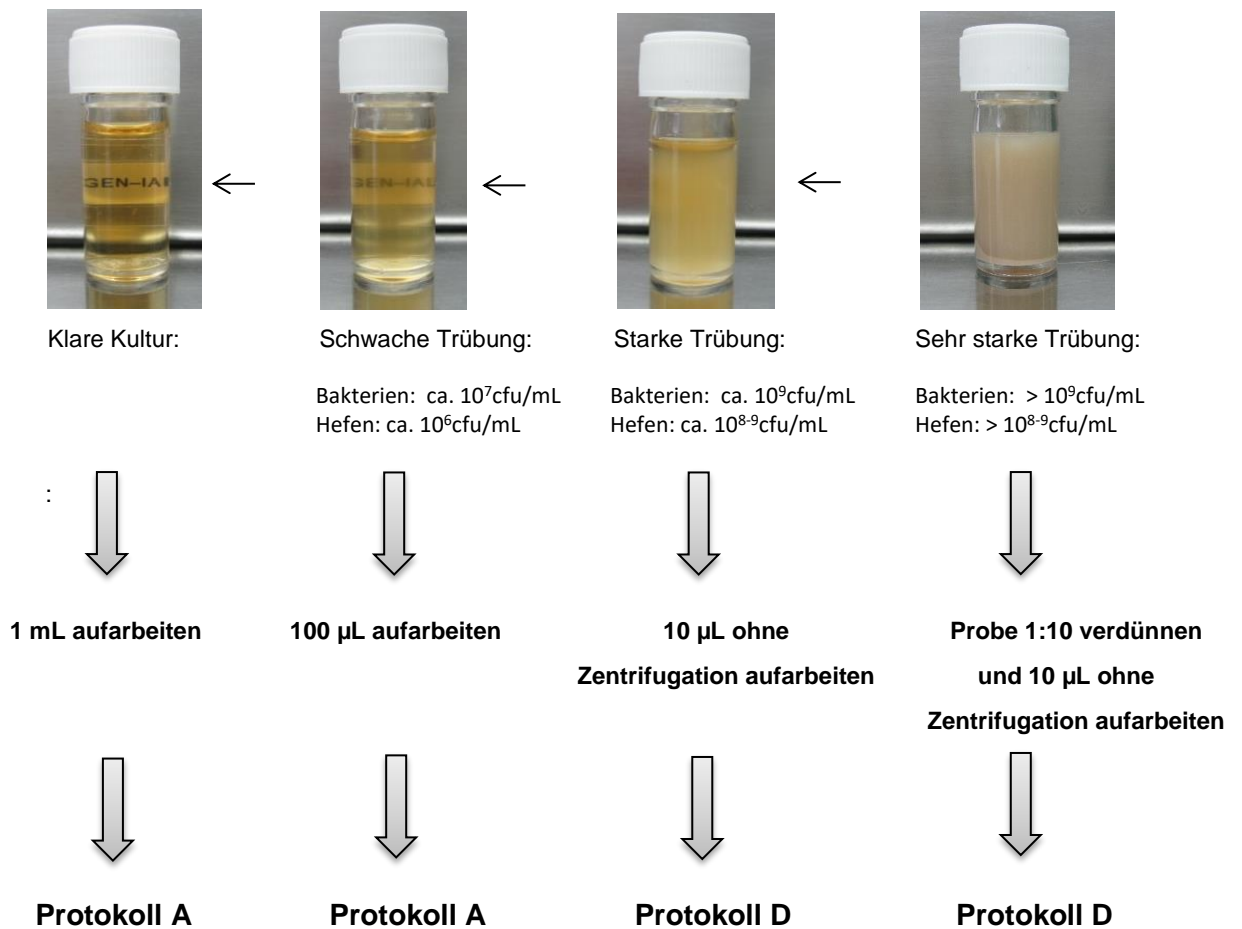
In PCR-Kits mit lyophilisierten PCR-Streifen ist die Lyticase bereits im PCR-tube vorgelegt (s. Handbuch PCR-Kit)

8. DNA-Extraktion

Hinweis: Zum Nachweis von Bakterien oder Sporen aus hefehaltigen Proben, sollte zuerst sequenziell zentrifugiert werden. Dazu Probe mischen und 1,5 mL für 5 Min. bei 580 x g zentrifugieren. Verbleibende Trübung im Überstand nach unterem Schema beurteilen und mit 1 mL / 100 µl oder 10 µl Überstand fortfahren.

Für stark hefehaltige Proben z.B. Gärtanks, Lagertanks usw. sollte das First-Yeast Sample Preparation Kit (Q005) verwendet werden.

Empfehlungen zur Probenahme aus einer vorangereicherten Kultur:



Protokoll A (aus 1 mL / 100 µl Probe, z.B. vorangereicherte Probe):

1. Probe mischen und 1 mL / 100 µL in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführen (1 mL für klare Proben, 100 µL für schwach trübe Proben)
2. Zentrifugation der Probe für 5 min. bei 15500 x g
3. Überstand entfernen
Optional für Proben mit potentiellen Inhibitoren (dunkle Biere, Rotwein): Zugabe von 100 µL Washing solution, Pellet resuspendieren, 5 min. bei 15500 x g zentrifugieren und Überstand entfernen
4. Zugabe von 100 µL QuickGEN buffer, Pellet resuspendieren und vortexen
5. **Optional für Hefen: 15 U Lyticase** hinzugeben und gut mischen. **In PCR-Kits mit lyophilisierten PCR-Streifen ist die Lyticase bereits im PCR-tube vorgelegt (s. Handbuch PCR-Kit).**
6. 2,5 - 5 µL der DNA (s. Handbuch PCR-Kit) in die PCR einsetzen (bei Inhibition, die Probe 1:10 mit QuickGEN buffer verdünnen)

Protokoll B (aus 30 mL Flüssigkeit direkt ohne Voranreicherung):

1. Zentrifugation von 30 mL Flüssigkeit für 20 min. bei 5.500 x g in einem 50 mL Falcon tube
2. Überstand entfernen und Falcon kopfüber auf ein Filterpapier stellen
Optional für Getränke mit potentiellen Inhibitoren (dunkle Biere, Rotwein): Zugabe von 500 µL Washing solution, Pellet resuspendieren, 15 min. bei 5.500 x g zentrifugieren und Überstand entfernen
3. Zugabe von 100 µL QuickGEN buffer, Pellet mit Pipettenspitze resuspendieren oder vortexen
4. Überführen der Probe in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß
5. **Optional für Hefen: 15 U Lyticase** hinzugeben und gut mischen. **In PCR-Kits mit lyophilisierten PCR-Streifen ist die Lyticase bereits im PCR-tube vorgelegt (s. Handbuch PCR-Kit).**
6. 2,5 - 5 µL der DNA (s. Handbuch PCR-Kit) in die PCR einsetzen (bei Inhibition, die Probe 1:10 mit QuickGEN buffer verdünnen)

Protokoll C (aus Kolonie):

1. QuickGEN buffer entsprechend der Koloniegroße (siehe Punkt 2) in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß vorlegen
2. Mit einer Impföse (Größe 1 µL) eine Kolonie mit einem Durchmesser von bis zu 1 mm (s. Abb.) in 100 µL QuickGEN buffer vollständig lösen ggf. vortexen. Ist die Kolonie >1 mm nur einen Teil der Kolonie entnehmen und in 100 µL QuickGEN buffer lösen ggf. vortexen. Sehr kleine, kaum sichtbare Klonien in 50 µL QuickGEN buffer lösen.



3. **Optional für Hefen: 15 U Lyticase** hinzugeben und gut mischen. **In PCR-Kits mit lyophilisierten PCR-Streifen ist die Lyticase bereits im PCR-tube vorgelegt (s. Handbuch PCR-Kit).**
4. 2,5 - 5 µL der DNA (s. Handbuch PCR-Kit) in die PCR einsetzen (bei Inhibition, die Probe 1:10 mit QuickGEN buffer verdünnen)

Protokoll D (z.B. aus Reinzuchtheefe):

1. 10 µL Probe in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführen
2. Zugabe von 100 µL QuickGEN buffer und ggf. vortexen
3. In Abhängigkeit vom eingesetzten Hefe PCR-Kit (in manchen Kits ist die Lyticase bereits im PCR-tube vorgelegt s. Handbuch PCR-Kits) 15 U Lyticase zugeben
4. 2.5 µL der DNA in die PCR einsetzen (bei Inhibition, die Probe 1:10 mit QuickGEN buffer verdünnen)

Protokoll E (aus Abstrichproben):

1. Abstrichprobe (Tupfer abschneiden) in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß geben
2. Zugabe von 200 µL QuickGEN buffer (Tupfer sollte vollständig bedeckt sein) und 30 sec. vortexen **Optional für Hefen: 15 U Lyticase** hinzugeben und gut mischen. **In PCR-Kits mit lyophilisierten PCR-Streifen ist die Lyticase bereits im PCR-tube vorgelegt (s. Handbuch PCR-Kit).**
3. 2.5 µL – 5 µL der DNA in die PCR einsetzen (bei Inhibition, die Probe 1:10 mit QuickGEN buffer verdünnen)

QuickGEN Sample Preparation Centrifugation

1. Intended use

Fast and optimal DNA-extraction from bacteria and yeast out of beverages (beer, red wine) without preenrichment, colonies from agar plates and preenriched cultures by centrifugation

2. Content

The kit contains reagents for 50 - 100 extractions, depending on the protocol:

1 x QuickGEN buffer

1 x Washing solution

3. Materials required, but not provided

3.1 Instruments

- Centrifuge
- Pipettes
- "Vortex"

3.2 Reagents and plastic ware

- for yeast DNA-extraction: Lyticase (Sigma L2524) **in PCR-Kits with freeze-dried stripes the PCR-tubes contain lyticase (s. PCR Kit manual).**
- safe-lock reaction tubes 1.5 – 2.0 mL
- suitable filter tips
- single use gloves

4. Warnings

Careful use with personal protection according to good laboratory practice is recommended.
Do not incorporate. Avoid skin and eye contact with all solutions

5. Storage

Store all solutions at room temperature 15 – 30 °C (59 – 86 °F)

6. Indications of deterioration of reagents

In case of accurate handling deterioration unknown

7. Preliminary preparations

Prepare Lyticase solution:

5U / μ L in lyticase buffer (50 % 1xTE+50 % Glycerol, pH-Wert 7.5 – 8.0). **In PCR-Kits with freeze-dried PCR stripes the tubes contain lyticase (s. PCR Kit manual).**

Store solution at -20 °C (- 4 °F)

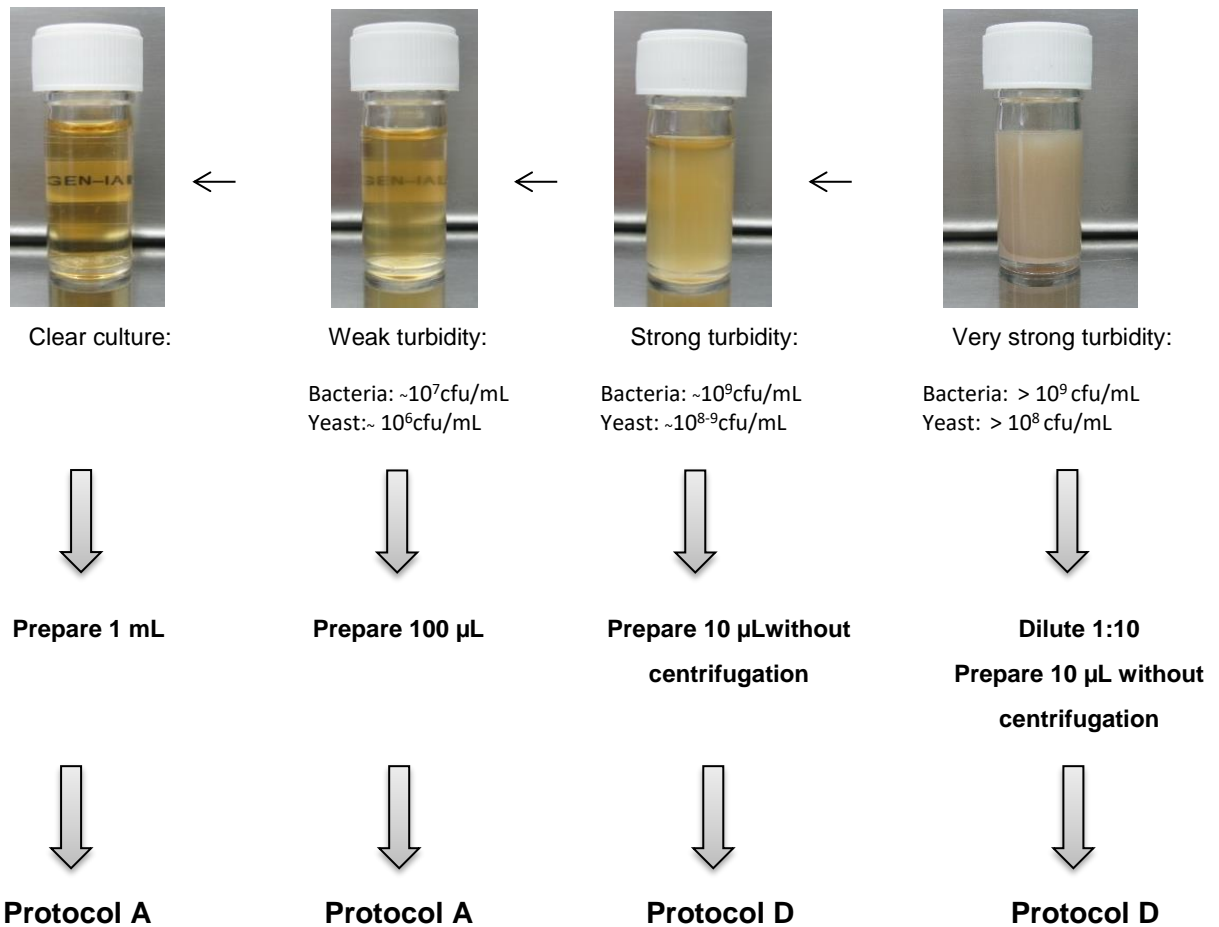
8. DNA-Extraction

Hint: For the detection of bacteria or spores in samples with high concentrations of yeast cells the following centrifugation protocol should be used:

Centrifuge 1.5 mL for 5 min. at 580 x g. Carry over 1 mL / 100 μ L or 10 μ L of the supernatant to a 1.5 mL reaction tube according to the hints for sampling of preenriched cultures

For samples with high yeast cell counts e.g. yeast tanks, propagation etc. the First-Yeast Sample Preparation Kit (Q005) should be used

Hints for sampling of preenriched cultures:



Protocol A (for 1 mL / 100 µL sample e.g. preenriched sample)

1. Mix the sample and transfer 1 mL/ 100 µL in a 1.5 mL reaction tube (1 mL for clear samples, 100 µL for weak turbid samples)
2. Centrifuge the sample for 5 min. at 15.500 x g
3. Remove the liquid
Optional for samples with potential inhibitors (e.g. dark beer, red wine): add 100 µL Washing solution, resuspend the pellet, centrifuge the sample for 5 min. at 15.500 x g and remove the liquid
4. Add 100 µL QuickGEN buffer, resuspend the pellet (e.g. vortex or pipette tip)
5. ***Optional for yeast:* Add 15 U Lyticase** and mix the sample. **In PCR-Kits with freeze-dried PCR stripes the tubes contain lyticase (s. PCR Kit manual).**
6. Use 2.5 - 5 µL of the DNA for PCR depending on the used PCR-Kit (if PCR is inhibited dilute the sample 1:10 in QuickGEN buffer)

Protocol B (for 30 mL beverage sample)

1. Centrifuge 30 mL sample for 20 min. at 5.500 x g in a 50 mL falcon tube
2. Remove the liquid and turn the falcon tube upside down on a waterleaf paper
Optional for samples with potential inhibitors (e.g. dark beers, red wine): add 500 µL washing solution, resuspend the pellet, centrifuge the sample for 15 min. at 5.500 x g and remove the liquid
3. Add 100 µL QuickGEN buffer to the pellet and resuspend (e.g. vortex or pipette tip)
4. Fill the volume into a 1.5 mL reaction tube to avoid cross contamination later on
5. ***Optional for yeast:* Add 15 U Lyticase** and mix the sample. **In PCR-Kits with freeze-dried PCR stripes the tubes contain lyticase (s. PCR Kit manual).**
6. Use 2.5 - 5 µL of the DNA for PCR depending on the used PCR-Kit (if PCR is inhibited dilute the sample 1:10 in QuickGEN buffer)

Protocol C (for bacteria or yeast colony)

1. Add QuickGEN buffer in a 1.5 mL reaction tube according to the size of the colony (see step 2)
2. Pick a colony (≤ 1 mm) with an inoculating loop (size 1 μ L) and solve it in 100 μ L of the QuickGEN buffer. For colonies > 1 mm, take only a part of the colony and solve it in 100 μ L QuickGEN buffer. Very small colonies have to be solved in 50 μ L QuickGEN buffer.



3. ***Optional for yeast:*** Add 15 U Lyticase and mix the sample. **In PCR-Kits with freeze-dried PCR stripes the tubes contain lyticase (s. PCR Kit manual).**
4. Use 2.5 - 5 μ L of the DNA for PCR depending on the used PCR-Kit (if PCR is inhibited dilute the sample 1:10 in QuickGEN buffer)

Protocol D (e.g. for culture yeast)

1. Transfer 10 μ L sample in a 1.5 mL reaction tube
2. Add 100 μ L QuickGEN buffer and vortex
3. **Add 15 U Lyticase** and mix the sample. **In PCR-Kits with freeze-dried PCR stripes the tubes contain lyticase (s. PCR Kit manual).**
4. Use 2.5 - 5 μ L of the DNA for PCR depending on the used PCR-Kit (if PCR is inhibited dilute the sample 1:10 in QuickGEN buffer)

Protocol E (for swabs)

1. Place the swab into a 1.5 mL reaction tube
2. Add 200 μ L QuickGEN buffer (the swab should be completely be covered) and vortex 30 sec.

Optional for yeast DNA isolation: add 15 U Lyticase and mix the sample. **In PCR-Kits with freeze-dried PCR stripes the tubes contain lyticase (s. PCR Kit manual).**

3. Use 2.5 - 5 μ L of the DNA for PCR (if PCR is inhibited dilute the sample 1:10 in QuickGEN buffer)