



INSTITUT FÜR ANGEWANDTE LABORANALYSEN GMBH

QuickGEN PCR Kit

Dekkera bruxellensis quantitative

- high -

Quantitativer Real-time PCR Nachweis von
Dekkera bruxellensis

Quantitative real-time PCR detection of
Dekkera bruxellensis

REF: Q371

Version 01/20

GEN-IAL GmbH
Tel: 02241 2522980
Fax: 02241 2522989
info@gen-ial.de
www.gen-ial.de

QuickGEN PCR Kit

Dekkera bruxellensis quantitativ

1. Verwendungszweck

Qualitativer und quantitativer Nachweis von *Dekkera bruxellensis* in Getränken (z.B. Wein und Most).

2. Testprinzip

Die Detektion erfolgt mittels Fluoreszenzmessung durch das Hydrolysesondenformat (TaqMan®). Durch hot-start-PCR plus einer doppelt markierten sequenzspezifischen Sonde (FAM/DQ) wird bei korrekter Hybridisierung an die Zielsequenz in der Extensions-Phase ein messbares Fluoreszenzsignal definierter Wellenlänge emittiert. Eine Inhibitionskontrolle (HEX/DQ) wird gleichzeitig mit der spezifischen Sequenz in einem Reaktionsgefäß amplifiziert um falsch negative Ergebnisse durch Inhibition auszuschliessen. Die PCR-Systeme enthalten dUTP, welches bei der Elongation zum Teil das dTTP ersetzt. Die Verwendung von Uracil-N-Glycosylase (UNG) eliminiert alle dUMP enthaltenden Amplikons, die aus eventuellen Kontaminationen früherer PCRs stammen könnten. Das UNG Enzym ist in diesem Kit nicht enthalten. **In den tubes ist die Lyticase bereits enthalten.**

3. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien können 48 Bestimmungen durchgeführt werden:

1 x Premix	weißer Deckel
48 x Dye Strips (lyophilisiert, tubes inkl. Lyticase und IC-DNA)	tube strips
6 x Cap Strips	
1 x ddH ₂ O	farbloser Deckel
1 x Control-DNA (Standard 2, <i>D. bruxellensis</i> , lyophilisiert)	gelber Deckel
Standard 2 =20000 Zellen/2,5 µL DNA	
1 x Solution S (zur Aufnahme der Control-DNA)	grüner Deckel

4. Lagerung

Die lyophilisierte Control-DNA muss vor Gebrauch in Solution S gelöst werden (siehe Punkt 6.1).

Die lyophilisierten Dye Strips und die lyophilisierte Control-DNA nicht einfrieren.

Die PCR-Reagenzien bei 2 – 8 °C lagern. Den Premix nach Anbruch und die gelöste Control-DNA bei -20 °C lagern.

Wiederholtes Auftauen und Einfrieren (> 3x) sollte vermieden werden, da dadurch die Sensitivität verringert wird. Bei unregelmäßigem Gebrauch sollte deshalb der Premix aliquotiert werden.

Die Dye Strips enthalten die fluoreszenzmarkierten Sonden und sind lichtempfindlich. Aus diesem Grund sollten sie keinem unnötigen Lichteinfall ausgesetzt werden.

Alle Reagenzien sind bei korrekter Lagerung 12 Monate haltbar

5. Zusätzlich erforderliches Material

5.1. Geräte

Real-time PCR Gerät für high profile PCR tubes

Zentrifuge passend für 1,5 – 2,0 mL Reaktionsgefäße

Zentrifuge für Strips

Pipetten

„Vortex“

5.2. Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

steriles, doppelt-destilliertes oder deionisiertes Wasser (ddH₂O)

passende, sterile Filterspitzen (Filtertips)

optional: Uracil N-Glycosylase (0,01 U/μL PCR-Reaktion)

6. PCR

6.1. PCR-Ansatz

Vor der ersten Benutzung muss die lyophilisierte Control-DNA kurz zentrifugiert und in Solution S gelöst werden:

- die lyophilisierte Control-DNA in 55 µL Solution S aufnehmen
- 30 Minuten lösen lassen

Alle PCR-Komponenten vor Gebrauch gut mischen und kurz abzentrifugieren.

Die Folie von den benötigten tube strips entfernen und die PCR-Komponenten pipettieren. Nach dem Pipettieren die tube strips mit den mitgelieferten cap strips verschließen.

PCR-Ansatz pro Probe:

PCR-Komponenten	Menge (µL)
Premix	17,5
Proben-DNA	2,5
Gesamtvolumen	20,0

1. Je 17,5 µL Premix in die einzelnen PCR-Reaktionsgefäße füllen.
2. 2,5 µL Proben-DNA zu den vorbereiteten PCR Gefäßen geben, für die PCR-Positivkontrolle 2,5 µL Control-DNA, für die Extraktionskontrolle 2,5 µL und für die PCR-Negativkontrolle* 2,5 µL steriles ddH₂O dazugeben (Pipettenspitzen unbedingt nach jeder Probe wechseln) .
3. Die PCR-Gefäße sofort verschließen und kurz zentrifugieren.
4. Die PCR-Gefäße ins PCR-Gerät stellen und den Lauf starten.

Sehr wichtig: * Die PCR-Negativkontrolle bitte auf jeden Fall mit 2,5 µL ddH₂O auffüllen, um unspezifische Amplifikationen zu verhindern.

Zügig arbeiten, Lichteinfall und Erwärmung der Ansätze vermeiden

6.2 PCR-Programm

Anmerkung:

Im Premix befindet sich kein ROX. Dies muss teilweise bei der Einstellung der gerätespezifischen Software vor dem Lauf berücksichtigt werden. **ABI 7500:** Unter "Assign Targets and Samples" in `Select the dye to use as the passive reference` „none“ auswählen.

Mx3500P: Unter Instrument in `Filter Set Gain Settings` folgende Filter set gain multipliiert einstellen: CY5 x1; ROX x1, HEX x4 und FAM x8.

Für die Verwendung von UNG müssen die Programme entsprechend der Herstellerangaben geändert werden.

Step	Time	Temp.	
Lyticase treatment	15 min	37 °C	
Initial denaturation	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	10 sec	95 °C	Cycle 40 x
Cycling Annealing/ Elongation	35 sec	63 °C	

7. Auswertung

A. qualitativ

Die Auswertung wird entsprechend der für das Real-time PCR-Gerät verwendeten Software durchgeführt (siehe Herstellerangaben).

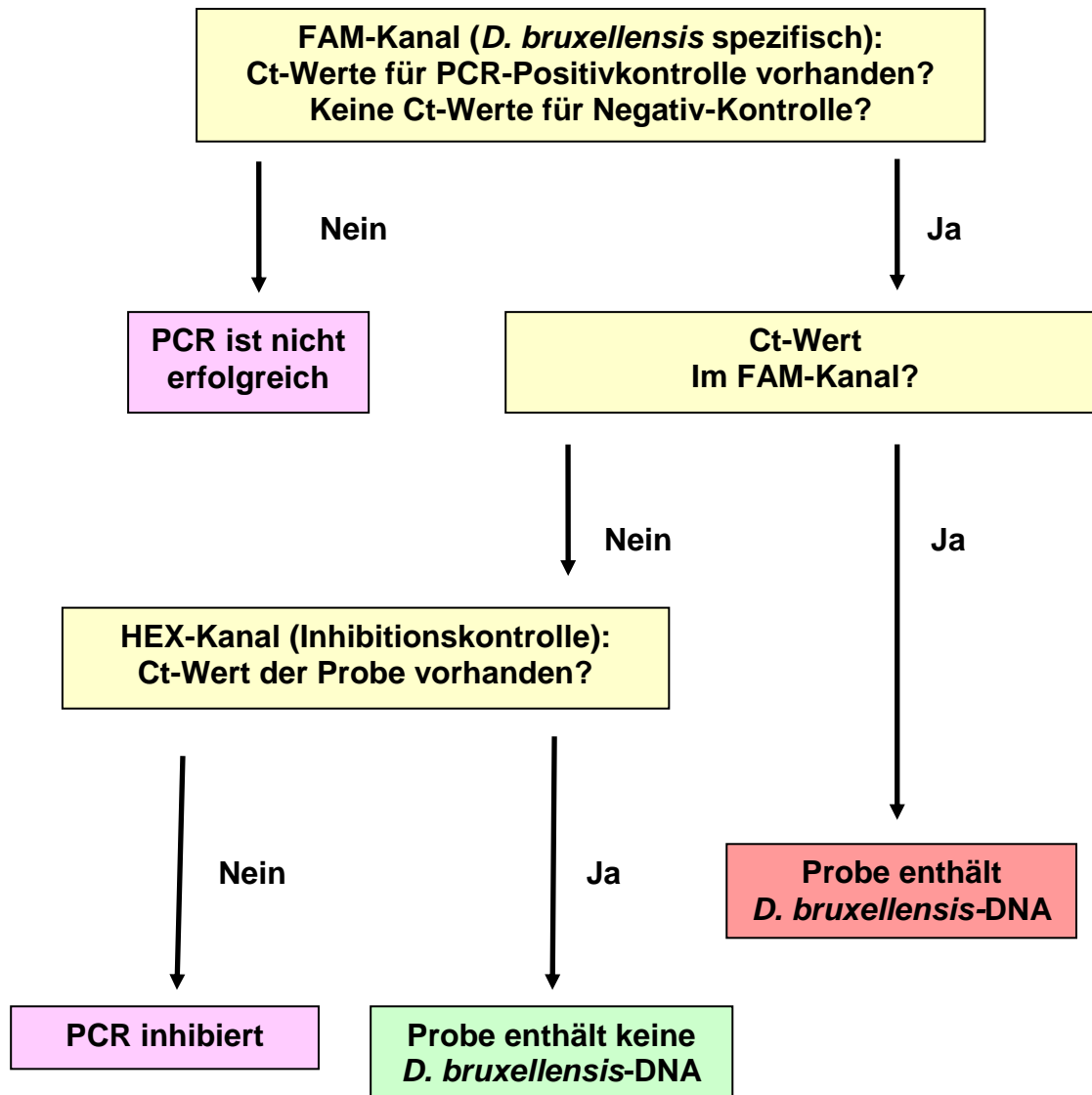
***Dekkera bruxellensis*-DNA:** FAM-Kanal

Inhibitionskontroll-DNA: HEX-Kanal

Eine Probe wird als ***Dekkera bruxellensis* positiv** bewertet, wenn der Ansatz der Probe im **FAM-Kanal** positiv ist und die Negativkontrollen negativ sind. Die Positivkontrollen müssen positiv sein. Die Inhibitionskontrolle im HEX-Kanal kann im Probenansatz positiv oder negativ sein, abhängig von der DNA-Menge oder Inhibitoren im Reaktionsansatz. In den Negativkontrollen muss sie positiv sein.

Eine Probe wird als negativ bewertet, wenn der Ansatz der Probe im FAM-Kanal negativ ist und die PCR-Positivkontrolle gleichzeitig positiv ist. Die PCR-Negativkontrolle muss im FAM-Kanal negativ sein. Die Inhibitionskontrolle im HEX-Kanal muss im Probenansatz positiv sein, um ein falsch negatives Ergebnis durch inhibitorische Effekte auszuschließen.

Analysediagramm



B. quantitativ

Die quantitative Auswertung wird entsprechend der für das real-time PCR-Gerät verwendeten Software durchgeführt (s. Herstellerangaben). Falls die automatische Datenanalyse nicht ausreichend ist, kann die *threshold* manuell bis zu einer optimalen Effizienz verschoben werden.

In einer quantitativen real-time PCR sollten die ct-Werte mit zunehmender DNA-Menge linear abnehmen. Die gerätespezifische Software kalkuliert die Standardkurve und deren Steigung anhand der eingegebenen DNA Konzentrationen und zugehörigen gemessenen ct-Werte. Die Standardreihe sollte einen Fehler $< 0,1$ haben und eine möglichst optimale PCR-Effizienz. Die Differenz der ct-Werte der Standardverdünnungen 1:10 sollte ungefähr bei 3,3 liegen. Stimmen die ct-Werte der PTC mit dem ct-Wert des Standards 2 der Standardreihe überein? Abweichungen von ca. 0.5 ct nach oben oder unten sind akzeptabel. Bei größeren Abweichungen neu pipettieren. Die ct-Werte der Proben werden automatisch mit der Standardkurve verglichen und die DNA-Konzentrationen berechnet. Zur exakten Quantifizierung sollten die ct-Werte der Proben-DNAs im Bereich der ct-Werte der Standardreihe liegen.

Zur Berechnung der *Dekkera bruxellensis* Konzentration pro mL Probe werden die gemessenen Werte der Probe mit 40 multipliziert. Dieser Faktor berechnet sich aus dem vorliegenden DNA-Volumen von 100 μL nach der DNA-Isolation (SEW 0100, CSE 0100) und den davon pipettierten 2,5 μL .

Beispiel:

Gemessener Wert von $4,61\text{E}+03 = 4610 \times 40 = 1,8 \times 10^5$ cfu / mL Probe

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. GEN-IAL übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen nicht.

Rechtlicher Hinweis: Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist patentrechtlich geschützt und somit lizenzpflichtig. Sie ist im Besitz der Hoffman-La Roche Inc. Diese Produktinformation versteht sich nicht als Autorisierung oder Lizenzierung, die PCR-Methode kommerziell anzuwenden.

QuickGEN PCR Kit

Dekkera bruxellensis quantitative

1. Intended use

Qualitative and quantitative detection of *Dekkera bruxellensis* in wine and grape must.

2. Test principle

The real-time PCR is based on hot-start-PCR and sequence-specific dual labelled probes (TaqMan[®]), which, when accurately hybridised, emit a measurable fluorescent signal of a defined wavelength in the extension phase. The increase of signal is continuously measured in a real-time PCR detection instrument.

The kit contains one specific system for the detection of *Dekkera bruxellensis*. The system emits a maximum fluorescent signal in the FAM/DQ channel. To avoid false negative PCR-results an Inhibition-Control is amplified together. To avoid false negative PCR-results an inhibition control is amplified together in the same reaction vessel with the specific sequence (HEX/DQ). The system contains dUTP. Optional: Use of Uracil-N-Glycosylase will eliminate any contamination with Uracil containing amplicons from former PCRs (the enzyme is not part of this kit). **The tubes contain lyticase.**

3. Kit contents

The kit contains sufficient reagents for 48 reactions:

1 x Premix	white cap
48 x Dye Strips (freeze-dried, tubes incl. lyticase and IC-DNA)	tube strips
6 x Cap Strips	
1 x ddH ₂ O	colourless cap
1 x Control-DNA (Standard 2, <i>D. bruxellensis</i> , freeze-dried) Standard 2 =20000 cells/2,5 µL DNA	yellow cap
1 x Solution S (for solving Control-DNA)	green cap

4. Storage conditions

The Control-DNA is freeze-dried, it has to be solved in Solution S prior to use (see 6.1).

Do **not** freeze the lyophilized Dye Strips and lyophilized Control-DNA.

The PCR reagents should be stored at 2 – 8 °C (35 – 46 °F).

Keep Premix for storage at - 20 °C (- 4 °F) after opening. Avoid loss of sensitivity by repeating freezing and thawing more than 3 times. For irregular use aliquot the Premix.

The Dye Strips contain the fluorescent labelled probes and should be handled light protected.

All reagents are stable for 12 months, if they are stored correctly.

5. Materials required, but not provided

5.1. Instruments

Real-time PCR machine for high profile tubes

Centrifuge for 1.5 – 2.0 mL reaction tubes

Centrifuge for strips

Pipettes

“Vortex”

5.2. Reagents and plastic ware

sterile ddH₂O

sterile filter tips

optional: Uracil N-Glycosylase (0.01 U/μL added to the PCR reaction mix)

6. PCR

6.1. PCR-Setup

When using the kit for the first time, the freeze-dried Control-DNA has to be shortly centrifuged and carefully resolved in Solution S

- add 55 µL Solution S to the freeze-dried Control-DNA
- after 30 minutes mix well

Before every use thoroughly mix all PCR-components and centrifuge briefly.

Remove the film from the needed tube strips and pipette the PCR-Components. After pipetting close the tube strips with the provided cap strips.

PCR-reaction per sample:

PCR-Components	amount (µL)
Premix	17.5
Sample-DNA	2.5
Total volume	20.0

1. Pipette 17.5 µL of the Premix into each PCR-tube, making sure that, prior to the first filling, the tip of the pipette has been moistened.
 1. Add 2.5 µL sample DNA, add 2.5 µL of the Control-DNA for the PCR positive control, add 2.5 µL of the extraction control and 2.5 µL of ddH₂O for the negative control* reaction. Use a fresh tip with each DNA filling.
2. Close the tubes immediately and centrifuge them shortly.
3. Place the tubes in the PCR machine and start run.

Very important: * Please fill up the negative control with 2.5 µL ddH₂O to avoid unspecific amplification.

Work swiftly to avoid warming up and keep away from light

6.2 PCR-Program

The Premix contains no ROX. This must be considered according to the settings of the real-time machine. **ABI 7500:** Under “Assign Targets and Samples” in ‘Select the dye to use as the passive reference’ choose „none“.

Mx3500P: Under Instruments in ‘Filter Set Gain Settings’ change the Filter set gain multiplier to CY5 x1, ROX x1, HEX-JOE x4 und FAM x8.

For the use of UNG the thermal cycler program has to be changed according to manufacturers instructions.

Step	Time	Temp.	
Lyticase treatment	15 min	37 °C	
Initial Denaturation	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	10 sec	95 °C	Cycle 40 x
Cycling Annealing/ Elongation	35 sec	63 °C	

7. Evaluation

A. qualitative

The evaluation has to be made according to the data analysis programme recommended by the real-time instrument manufacturer.

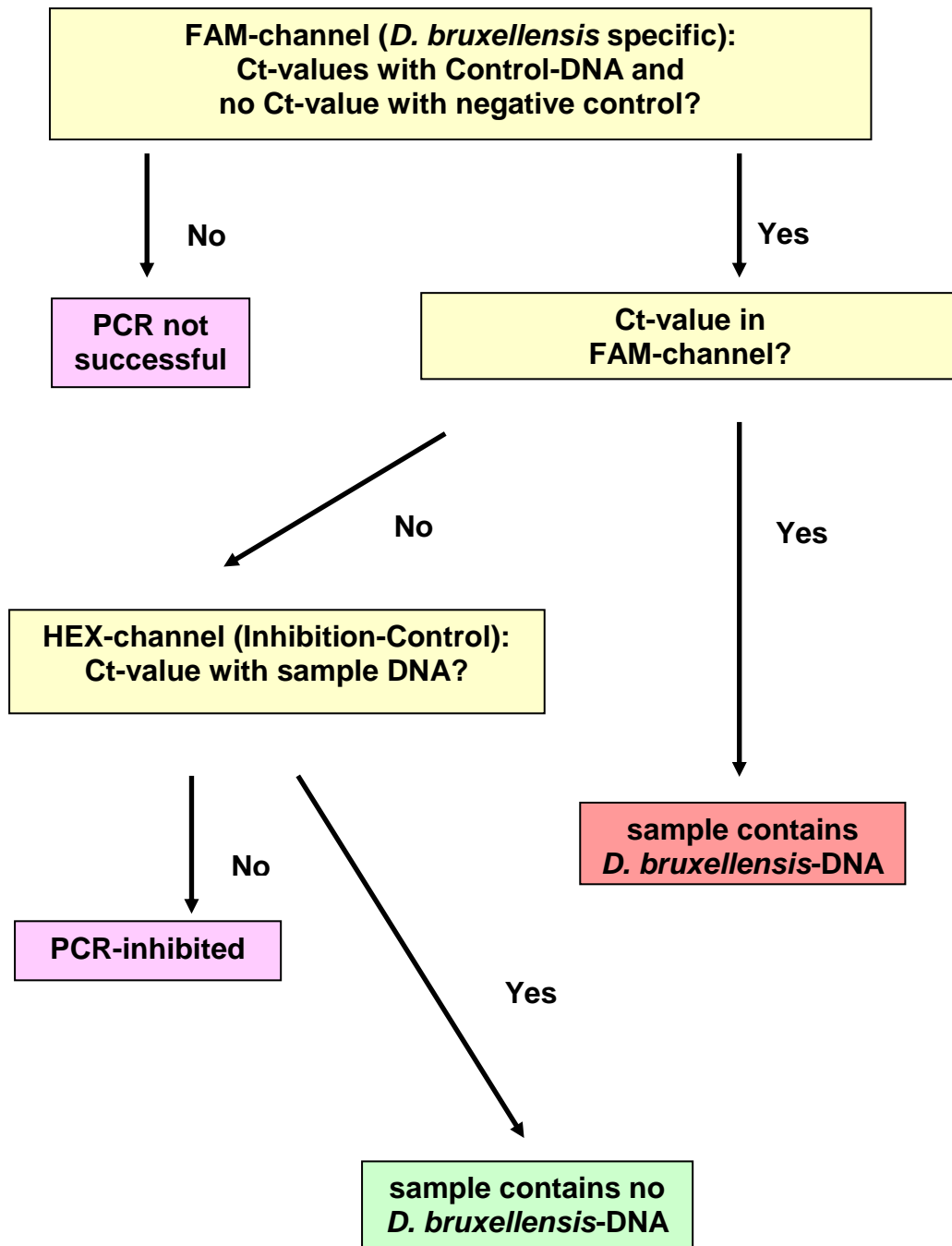
***Dekkera bruxellensis*-DNA:** FAM-channel

Inhibition Control-DNA: HEX-channel

A sample is ***Dekkera bruxellensis* positive**, if there is a detectable fluorescence increase in the **FAM-channel** and the negative controls show no amplification. The positive controls should have a positive fluorescence signal. The Inhibition Control in HEX-channel may be positive or negative (depending on the amount of DNA or inhibitors in the sample reaction). For negative controls it has to be positive.

A sample is **negative**, if there is no detectable fluorescence increase in FAM-channel and the positive controls have a positive fluorescence signal. The negative controls show no amplification in FAM-channel. The Inhibition Control in HEX-channel has to be positive in the sample and in the negative controls, a false negative result due to inhibitory effects is then excluded.

analysis flowchart



B. quantitative

Quantitative data analysis has to be made according to the data analysis program recommended by the real-time instrument manufacturer. For insufficient results with automatic data analysis, adjust the threshold manually to an optimal efficiency.

In a quantitative real-time PCR assay the ct-values should decrease linearly with ascending DNA concentration per reaction. The software provided with the real-time PCR machine calculates standard curve and slope using the DNA-concentrations stated by the user and the appendant ct-values. The standard row should have an error < 0.1 and an optimal PCR efficiency. The difference between the ct-values of the standard dilutions (at a ratio of 1:10) should be approximately 3.3. Fits the ct-value of the PTC to the ct-value of standard 2 of the standard row? Deviations of 0.5 ct up or down are acceptable. If not, repeat pipetting. The ct-values of the samples with unknown DNA concentrations are now automatically compared to the standard curve and concentrations are assigned.

For accurate quantification, the ct-values of the sample DNA should, as much as possible, lie within the range of the crossing points of the standard series.

For quantification of *Dekkera bruxellensis* concentration per mL sample, the measured values for the samples have to be multiplied with the factor 40. The factor is calculated from the DNA volume of 100 µL after DNA isolation (SEW 0100, CSE 0100) and pipetting of 2.5 µL.

Example:

measured value of $4.61E+03 = 4610 \times 40 = 1.8 \times 10^5$ cfu / mL sample

Note:

The polymerase-chain reaction (PCR) is protected by patents and requires a licence from Hoffmann-LaRoche Inc.. The provided product does not authorise the purchaser for the commercial use of this method.

GEN-IAL makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. If any materials are defective, GEN-IAL will provide a replacement product. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. GEN-IAL shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.