



INSTITUT FÜR ANGEWANDTE LABORANALYSEN GMBH

QuickGEN PCR Kit

Beer yeast and bacteria differentiation

- high -

Real-time PCR Nachweis und Differenzierung getränkeschädlicher
Bakterien und Hefen

real-time PCR detection and differentiation of beverage spoilage
bacteria and yeast

REF: Q071

Version 01/20

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

QuickGEN PCR Kit

Beer yeast and bacteria differentiation

1. Verwendungszweck

Differenzierung von bierschädlichen Hefen und Bakterien in Bier und Biermischgetränken. Folgende Bakterien und Hefen werden differenziert:

Lactobacillen, *Pediococcen*, Essigsäurebakterien, *Enterobacteriaceae*, Untergärige Hefe, Obergärige Hefe und Fremdhefen.

2. Testprinzip

Die Detektion erfolgt mittels Fluoreszenzmessung durch das Hydrolysesondenformat (TaqMan®). Durch hot-start-PCR plus doppelt markierter sequenzspezifischer Sonden (FAM/DQ; HEX/DQ; ROX/DQ), wird bei korrekter Hybridisierung an die Zielsequenz in der Extension-Phase ein messbares Fluoreszenzsignal definierter Wellenlänge emittiert. Eine Inhibitionskontrolle (HEX/DQ) wird zusammen mit der spezifischen Sequenz in einem Tube 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 4, 5, 7 und 8 ist Lyticase bereits enthalten.**

3. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien können 96 Bestimmungen (24 Proben) durchgeführt werden:

1 x Premix	weißer Deckel
12 x Dye Strips (lyophilisiert, tubes 4, 5, 7 und 8 enthalten Lyticase)	tube strips
12 x Cap Strips	
1 x ddH ₂ O (für PCR-Negativkontrollen)	farbloser Deckel

4. Lagerung

Die lyophilisierten Dye Strips nicht einfrieren.

Die PCR-Reagenzien bei 2 – 8 °C, den Premix nach Anbruch 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 nicht unnötigem 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 für tube 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

Premix vor Gebrauch gut mischen und ggf. 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	15,0
Proben-DNA	5,0*
Gesamtvolumen	20,0

* bei Verwendung des Simplex Easy DNA- oder QuickGEN Yeast Sample Preparation Kits: 2,5 µL DNA einsetzen und 2,5 µL steriles ddH₂O hinzufügen

Pipettierschema:

Tube 1*	Premix 15,0 µL	ddH ₂ O 5,0 µL, Achtung: keine Proben-DNA pipettieren (Negativkontrolle)
Tube 2*	Premix 15,0 µL	ddH ₂ O 5,0 µL, Achtung: keine Proben-DNA pipettieren (Positivkontrolle)
Tube 3*	Premix 15,0 µL	Proben-DNA der Probe 1 5,0 µL
Tube 4*	Premix 15,0 µL	Proben-DNA der Probe 1 5,0 µL
Tube 5*	Premix 15,0 µL	Proben-DNA der Probe 1 5,0 µL
Tube 6*	Premix 15,0 µL	Proben-DNA der Probe 2 5,0 µL
Tube 7*	Premix 15,0 µL	Proben-DNA der Probe 2 5,0 µL
Tube 8*	Premix 15,0 µL	Proben-DNA der Probe 2 5,0 µL

* auf die Orientierung der Tubes achten: sie sind an der Seite mit 1,2,3... gekennzeichnet

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 of DNA	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	15 sec	95 °C	Cycle 30 ¹ -35 x
Cycling Annealing/ Elongation	20-30 sec ²	62 °C	

¹ für vorangereicherte Proben 30 Zyklen programmieren

² wenn das PCR-Gerät eine Programmierung von 20 sec zulässt, dann bitte diese Zeit einstellen

7. Auswertung

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

Die in der Tabelle angegebene Negativkontrolle (NTC, Tube 1) muss negativ in den Kanälen FAM und HEX sein und positiv im Kanal ROX (Inhibitionskontrolle). Ist die Inhibitionskontrolle im ROX-Kanal negativ und/oder die Ergebnisse in den Kanälen FAM/HEX positiv, muss die PCR wiederholt werden.

Die in der Tabelle angegebenen Inhibitionskontrollen der Proben (Tube 4/7) müssen im ROX-Kanal positiv sein. Ist die Inhibitionskontrolle im ROX-Kanal negativ, deutet dies auf inhibitorische Komponenten oder eine zu hohe DNA-Menge im Reaktionsansatz hin.

Die in der Tabelle angegebene Positivkontrolle (Tube 2) muss im FAM-Kanal positiv sein. Ist sie im FAM-Kanal negativ, muss die PCR wiederholt werden.

* Fremdhefe 1 detektiert:

<i>Dekkera anomala</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Dekkera custersiana</i>	<i>Dekkera naardenensis</i>	<i>Debaromyces hansenii</i>
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Issotchenkia orientalis</i>	<i>Kazachstania exigua</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Pichia fermentans</i>	<i>Pichia membranaefaciens</i>
<i>S. cerevisiae var. diastaticus</i>	<i>Saccharomyces ludwigii</i>	<i>Torulasporea delbrückii</i>		

* Fremdhefe 2 detektiert:

<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida kefyr</i>	<i>Candida intermedia</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Candida sake</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Naumovozyma dairenensis</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>				

PCR-Auswertung:

auf die Orientierung der Tubes achten: sie sind an der Seite mit 1,2,3... gekennzeichnet

Tube	Probe	FAM	HEX	ROX
1	NTC	-	-	Inhibitionskontrolle
2	PTC	Positivkontrolle	-	-
3	1	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Lactobacillus / Pediococcus</i>	<i>Pediococcus</i>
4	1	Fremdhefe 1*	Untergärige Hefe	Interne Kontrolle
5	1	Fremdhefe 2*	Obergärige Hefe	Essigsäurebakterien
6	2	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Lactobacillus / Pediococcus</i>	<i>Pediococcus</i>
7	2	Fremdhefe 1*	Untergärige Hefe	Interne Kontrolle
8	2	Fremdhefe 2*	Obergärige Hefe	Essigsäurebakterien

NTC: Negativkontrolle

PTC: Positivkontrolle

Beispiel zur Auswertung:

Die Probe 1 zeigt ein positives FAM-Signal in Tube 4, dann handelt es sich um eine Fremdhefe 1*.

Bei Mischungen können positive Signale in den entsprechenden Kanälen vorliegen.

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

Beer yeast and bacteria differentiation

1. Intended use

Differentiation of beer spoilage bacteria and yeast in beer and beer mixing drinks.

The following bacteria and yeasts are differentiated:

Lactobacilli, *Pediococci*, Acetic acid bacteria, *Enterobacteriaceae*, Bottom-fermented yeast, Top-fermented yeast and wild yeast.

2. Test principle

The TaqMan[®] real-time PCR is based on hot-start PCR and sequence-specific dual labelled probes (FAM/DQ; HEX/DQ; ROX/DQ) 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.

To avoid false negative PCR-results an Inhibition Control is amplified together in one tube with the specific sequence. The system contains dUTP. Optional: the use of Uracil-N-Glycosylase will eliminate any contamination with Uracil containing amplicons from former PCRs (the enzyme is not part of this kit). **Tubes 4, 5, 7 and 8 contain lyticase.**

3. Kit contents

The kit contains sufficient reagents for 96 PCR reactions (24 samples):

1 x Premix	white cap
12 x Dye Strips (freeze-dried, tubes 4, 5, 7 und 8 contain lyticase)	tube strips
12 x Cap Strips	
1 x ddH ₂ O (for PCR negative controls)	colourless cap

4. Storage conditions

Do **not** freeze the lyophilized Dye Strips.

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 tube 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

Before every use thoroughly mix Premix 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 setup:

PCR-Components	amount (µL)
Premix	15.0
Sample-DNA	5.0*
Total volume	20.0

* if using the Simplex Easy DNA- or QuickGEN Yeast Sample Preparation Kit:
add 2.5 µL DNA and 2.5 µL sterile ddH₂O

Pipetting scheme:

Tube 1*	Premix 15.0 µL	ddH ₂ O 5.0 µL, Attention: pipette no sample-DNA (negative control)
Tube 2*	Premix 15.0 µL	ddH ₂ O 5.0 µL, Attention: pipette no sample-DNA (positive control)
Tube 3*	Premix 15.0 µL	sample-DNA of sample 1 5.0 µL
Tube 4*	Premix 15.0 µL	sample-DNA of sample 1 5.0 µL
Tube 5*	Premix 15.0 µL	sample-DNA of sample 1 5.0 µL
Tube 6*	Premix 15.0 µL	sample-DNA of sample 2 5.0 µL
Tube 7*	Premix 15.0 µL	sample-DNA of sample 2 5.0 µL
Tube 8*	Premix 15.0 µL	sample-DNA of sample 2 5.0 µL

* please notice the orientation of the tubes: they are marked with 1,2,3.....

6.2 PCR-Program

Note:

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 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 of DNA	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	15 sec	95 °C	Cycle 30 ¹ -35 x
Cycling Annealing/ Elongation	20-30 sec ²	62 °C	

¹for preenriched samples program 30 cycles

²please program 20 sec, if the real-time-PCR machine allows it

7. Evaluation

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

The negative control (NTC, tube 1) has to be negative in the FAM-, and HEX-channel and positive in the ROX-channel (Inhibition Control). Is the Inhibition Control in the ROX-channel negative and/or the results in the FAM-/ HEX-channel positive, PCR has to be repeated.

The Inhibition Controls in the samples (tubes 4/7) have to be positive in the ROX-channel. Is the Inhibition Control in the ROX-channel negative inhibitors or high amount of DNA are in the sample reaction.

The Positive Control (tube 2) has to be positive in the FAM-channel, if it is negative, PCR has to be repeated.

* Wild yeast 1 detects:

<i>Dekkera anomala</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Dekkera custersiana</i>	<i>Dekkera naardenensis</i>	<i>Debaromyces hansenii</i>
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Issotchenkia orientalis</i>	<i>Kazachstania exigua</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Metschnikowia pulcherrina</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Pichia fermentans</i>	<i>Pichia membranaefaciens</i>
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>	<i>Saccharomyces ludwigii</i>	<i>Torulaspota delbrückii</i>		

* Wild yeast 2 detects:

<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida kefir</i>	<i>Candida intermedia</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Candida sake</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Naumovozyma dairenensis</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>				

PCR-Analysis:

please notice the orientation of the tubes: they are marked with 1,2,3.....

Tube	Sample	FAM	HEX	ROX
1	NTC	-	-	Inhibition Control
2	PTC	Positive Control	-	-
3	1	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Lactobacillus / Pediococcus</i>	<i>Pediococcus</i>
4	1	Wild yeast 1*	Bottom fermented yeast	Inhibition Control
5	1	Wild yeast 2*	Top fermented yeast	Acetic acid bacteria
6	2	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Lactobacillus / Pediococcus</i>	<i>Pediococcus</i>
7	2	Wild yeast 1*	Bottom fermented yeast	Inhibition Control
8	2	Wild yeast 2*	Top fermented yeast	Acetic acid bacteria

NTC: negative Control PTC: positive Control

Example for interpretation:

If sample 1 shows a positive FAM-signal in tube 4, wild yeast 1 is identified. If the sample contains mixtures, you have positive signals in different channels.

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.