



INSTITUT FÜR ANGEWANDTE LABORANALYSEN GMBH

QuickGEN PCR Kit

Wild Yeast 1

- low -

Real-time PCR Nachweis von Fremdhefen 1

real-time PCR detection of wild yeasts 1

REF: Q522

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

Fremdhefen 1

1. Verwendungszweck

Nachweis von Fremdhefen in Bier und Biermischgetränken durch die Real-time-PCR (Polymerase Kettenreaktion) Methode.

Folgende Hefen werden detektiert:

<i>Dekkera anomala</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Dekkera custersiana</i>	<i>Dekkera naardenensis</i>	<i>Debaromyces hansenii</i>
<i>Hanseniaspora guillermondii</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>Pichia anomala</i>	<i>Pichia fermentans</i>	<i>Pichia membranaefaciens</i>
<i>Saccharomyces diastaticus</i>	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	<i>Torulasporea delbrückii</i>		

2. Testprinzip

Die Detektion erfolgt mittels Fluoreszenzmessung durch das Hydrolysesondenformat (TaqMan®). Durch hot-start-PCR plus doppelt markierter sequenzspezifischer Sonden (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

1 x Premix	weißer Deckel
48 x Dye Strips (lyophilisiert, inkl. IC-DNA und Lyticase)	tube strips
1 x ddH ₂ O	farbloser Deckel
1 x Control-DNA (lyophilisiert)	gelber Deckel

4. Lagerung

Die Control-DNA wird lyophilisiert geliefert und muss vor Gebrauch in ddH₂O gelöst werden (siehe Punkt 6.1).

Die lyophilisierten Dye Strips und die lyophilisierte Control-DNA 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 low 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 ddH₂O gelöst werden:

- die lyophilisierte Control-DNA in 55 µL ddH₂O aufnehmen
- 15 Minuten lösen lassen

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

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 pipettieren (Pipettenspitzen unbedingt nach jeder Probe wechseln).
3. Die PCR-Reaktionsgefäße 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:

Für die Verwendung von UNG muss das Programm 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	20 sec	62 °C	

Für MyGo Pro User

Software 3.3.2

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	20 sec	62 °C	

Advanced Settings	Integration time (s)	0.5
	Acquisitions per Cycle	10

Software 3.4.8

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	30 sec	62 °C	

Advanced Settings	Integration time (s)	0.5
--------------------------	----------------------	-----

7. Auswertung

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

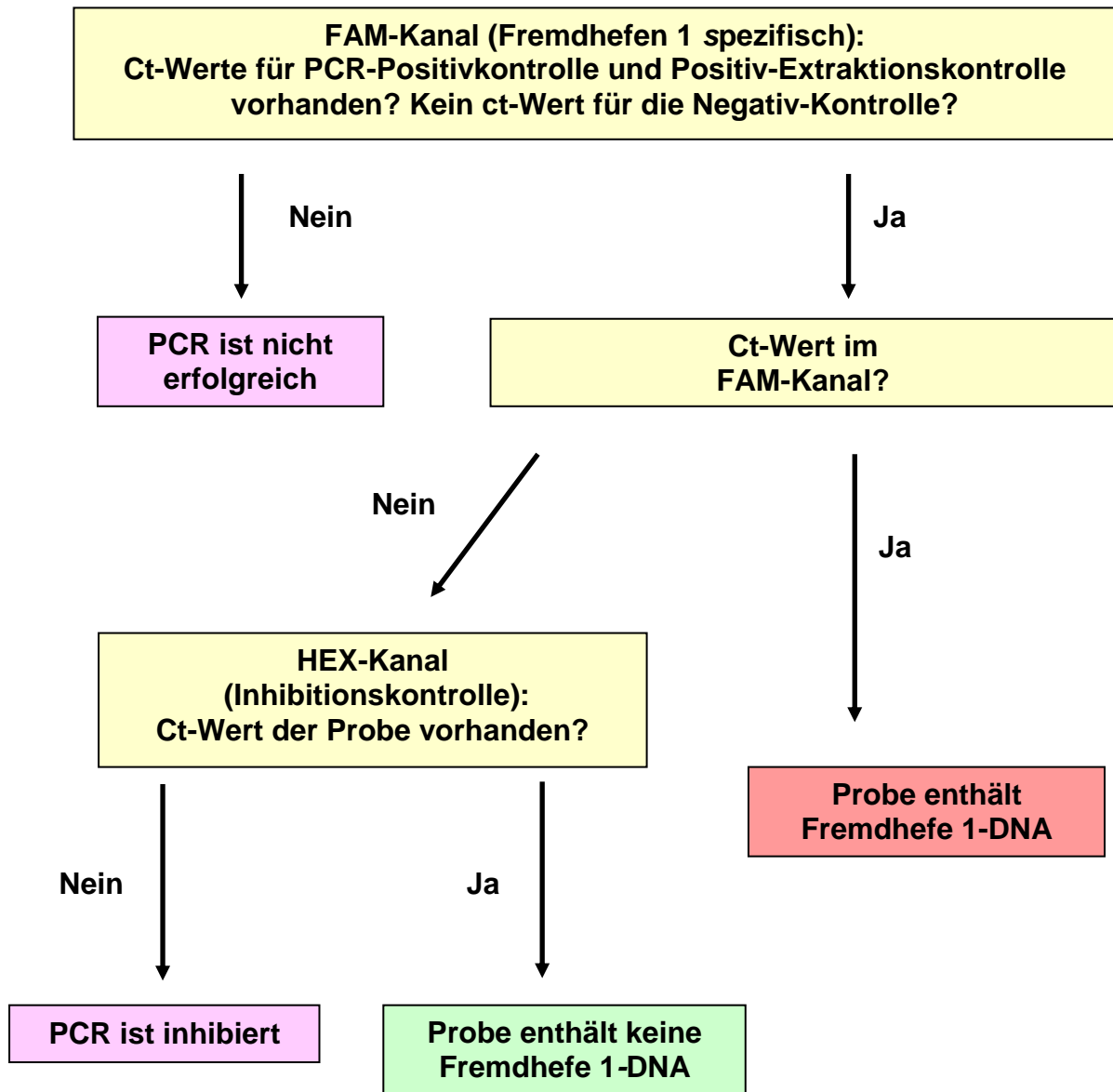
Fremdhefen1-DNA: FAM-Kanal

Inhibitionskontroll-DNA: HEX-Kanal

Eine Probe wird als **Fremdhefe 1** 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 DNA-Menge oder inhibitorischen Komponenten 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 und in den Negativkontrollen positiv sein, um ein falsch negatives Ergebnis durch inhibitorische Effekte auszuschließen.

Analysediagramm



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 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

Wild Yeast 1

1. Intended use

Detection of wild yeast in beverages by real-time PCR.

The following yeasts are detected:

<i>Dekkera anomala</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Dekkera custersiana</i>	<i>Dekkera naardenensis</i>	<i>Debaromyces hansenii</i>
<i>Hanseniaspora guillermondii</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>Pichia anomala</i>	<i>Pichia fermentans</i>	<i>Pichia membranaefaciens</i>
<i>Saccharomyces diastaticus</i>	<i>Saccharomyces ludwigii</i>	<i>Torulasporea delbrückii</i>		

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 a specific system for the detection of wild yeast group 1. The system emits a maximum fluorescent signal in the FAM/DQ channel. To avoid false negative PCR-results an Inhibition-Control is amplified together in the same reaction vessel with the specific sequence (HEX/DQ channel). 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, incl. IC-DNA and lyticase)	tube strips
1 x	ddH ₂ O	colourless cap
1 x	Control-DNA (freeze-dried)	yellow cap

4. Storage conditions

The Control-DNA is freeze-dried, it has to be solved in ddH₂O 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 low profile tubes

Centrifuge for 1.5 – 2.0 mL vials

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 ddH₂O:

- add 55 µL ddH₂O to the freeze-dried Control-DNA
- after 15 minutes mix well

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

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 has been moistened.
2. Add 2.5 µL sample DNA, for the PCR positive control, add 2.5 µL of the Control-DNA, 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.
3. Close the tubes immediately and centrifuge them shortly.
4. 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

Note: 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	20 sec	62 °C	

For MyGo Pro User

Software 3.3.2

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	20 sec	62 °C	

Advanced Settings	Integration time (s)	0.5
	Acquisitions per Cycle	10

Software 3.4.8

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	30 sec	62 °C	

Advanced Settings	Integration time (s)	0.5
--------------------------	----------------------	-----

7. Evaluation

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

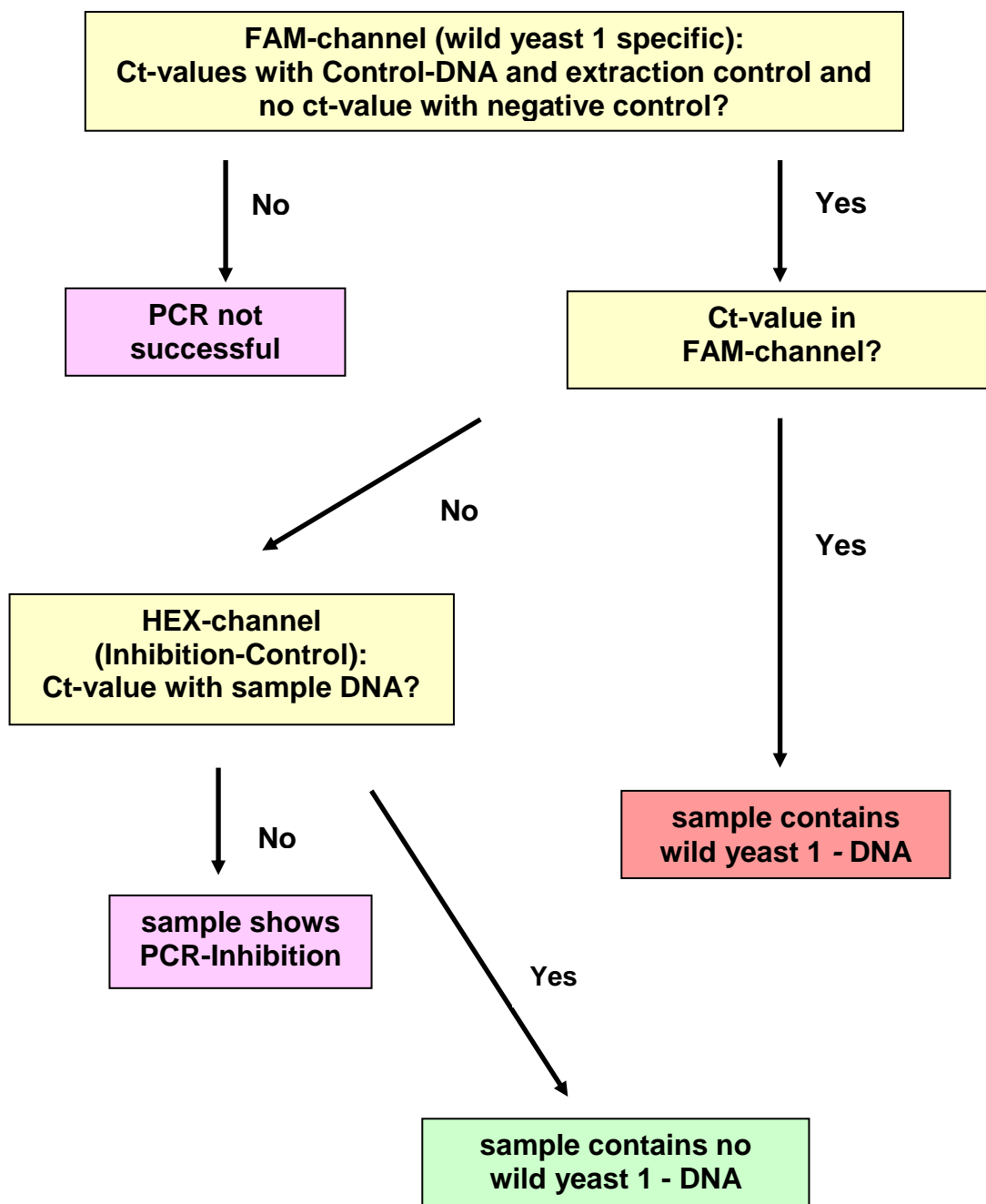
Wild yeast 1-DNA: FAM-channel

Inhibition Control-DNA: HEX-channel

A sample is **wild yeast 1 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 the 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 the FAM-channel and the positive controls have a positive fluorescence signal. The negative controls have to show no amplification in the FAM-channel. The Inhibition-Control in the 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



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.