



---

INSTITUT FÜR ANGEWANDTE LABORANALYSEN GMBH

## QuickGEN PCR Kit

P1 and *S. cerevisiae* var. *diastaticus* Screening

- low MG -

Real-time PCR Nachweis von  
bierschädlichen Bakterien und *S. cerevisiae* var. *diastaticus*

real-time PCR detection of  
beer spoilage bacteria and *S. cerevisiae* var. *diastaticus*

**REF: Q044**

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

## P1 und *S. cerevisiae* var. *diastaticus* Screening

### 1. Beispiele erfolgreich nachgewiesener Mikroorganismen

- *Lactobacillus* spp.
  - L. acetotolerans*
  - L. acidophilus*
  - L. amylolyticus*
  - L. amylovorus*
  - L. backii*
  - L. brevis*
  - L. brevisimilis*
  - L. buchneri*
  - L. casei* / *paracasei*
  - L. collinoides* / *paracollinoides*
  - L. coryniformis* ssp. *coryniformis*
  - L. coryniformis* ssp. *torquens*
  - L. curvatus*
  - L. delbrückii* ssp. *delbrückii*/ *lactis*
  - L. harbinensis*
  - L. helveticus*
  - L. johnsonii*
  - L. lindneri*
  - L. malefermentans*
  - L. parabrevis*
  - L. parabuchneri* (*frigidus*)
  - L. paucivorans*
  - L. pentosus*
  - L. perolens*
  - L. plantarum*
  - L. paraplantarum*
  - L. rossiae*
- *Lactococcus lactis*
- *Megasphaera* spp.
- *Micrococcus kristinae*
  - *Pectinatus* spp.
    - Pectinatus cerevisiiphilus*
    - Pectinatus frisingensis*
    - Pectinatus haikarae*
    - Pectinatus* ssp.
  - *Pediococcus* spp.
    - Pediococcus acidilactici*
    - Pediococcus damnosus*
    - Pediococcus dextrinicus*
    - Pediococcus inopinatus*
    - Pediococcus pentosaceus*
    - Pediococcus parvulus*
    - Pediococcus claussenii*
- *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*

## 2. Verwendungszweck

Nachweis von Bakterien- und *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* Kontaminationen in filtriertem Bier, Biermischgetränken und hefehaltigen Produkten.

## 3. Testprinzip

Die Detektion erfolgt mittels Fluoreszenzmessung durch das Hydrolysesondenformat (TaqMan®). Durch hot-start-PCR plus doppelt markierten sequenzspezifischen Sonden (FAM/DQ; HEX/DQ; ATTO/DQ) wird bei korrekter Hybridisierung an die Zielsequenz in der Extensions-Phase ein messbares Fluoreszenzsignal definierter Wellenlänge emittiert. Eine Inhibitionskontrolle (ROX/DQ) wird zusammen 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.**

## 4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien können 48 Bestimmungen durchgeführt werden:

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

## 5. Lagerung

**Die Control-DNA wird lyophilisiert geliefert und muss vor Gebrauch in ddH<sub>2</sub>O gelöst werden (siehe Punkt 7.1).**

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.

## 6. Zusätzlich erforderliches Material

### 6.1. Geräte

Real-time PCR Gerät für low profile PCR tubes  
Zentrifuge passend für 1,5 – 2,0 mL Reaktionsgefäße  
Zentrifuge für Strips  
Pipetten  
„Vortex“

### 6.2. Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

steriles, doppelt-destilliertes oder deionisiertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O)  
passende, sterile Filterspitzen (Filtertips)  
**optional:** Uracil N-Glycosylase (0,01 U/μL PCR-Reaktion)

## 7. PCR

### 7.1. PCR-Ansatz

*Vor der ersten Benutzung muss die lyophilisierte Control-DNA kurz zentrifugiert und in ddH<sub>2</sub>O gelöst werden:*

- die lyophilisierte Control-DNA in 55 µL ddH<sub>2</sub>O aufnehmen
- 15 Minuten lösen lassen und gut mischen

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

PCR-Ansatz pro Probe:

PCR-Komponenten	Menge (µL)
Premix	15,0
Proben-DNA	5,0*
Gesamtvolumen	<b>20,0</b>

\* bei Verwendung des Simplex Easy DNA- oder QuickGEN Yeast Sample Preparation Kits: 2,5 µL DNA einsetzen und 2,5 µL steriles ddH<sub>2</sub>O hinzufügen

1. Je 15,0 µL Premix in die einzelnen PCR-Reaktionsgefäße füllen
2. 5 µL Proben-DNA zu den vorbereiteten PCR Gefäßen geben, für die PCR-Positivkontrolle 5 µL Control-DNA, für die Extraktionskontrolle 5 µL und für die PCR-Negativkontrolle\* 5 µL steriles ddH<sub>2</sub>O 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 5 µL ddH<sub>2</sub>O auffüllen, um unspezifische Amplifikationen zu verhindern.**

**Zügig arbeiten, Lichteinfall und Erwärmung der Ansätze vermeiden.**

## 7.2 PCR-Programm

### Anmerkung:

Für die Verwendung von UNG muss das Programm entsprechend den Herstellerangaben geändert werden.

### 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 30*-35 x
Cycling Annealing/ Elongation	20 sec	63 °C	

\* für vorangereicherte Proben 30 Zyklen programmieren

<b>Advanced Settings</b>	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 30*-35 x
Cycling Annealing/ Elongation	30 sec	63 °C	

\* für vorangereicherte Proben 30 Zyklen programmieren

<b>Advanced Settings</b>	Integration time (s)	0.5
--------------------------	----------------------	-----

## 8. Auswertung

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

**Lactobacillus/ Pediococcus-DNA:** FAM-Kanal

**Megasphaera/ Pectinatus-DNA:** HEX-Kanal

**Inhibitionskontroll-DNA:** ROX-Kanal

***S. cerevisiae* var. *diastaticus*-DNA:** ATTO-Kanal

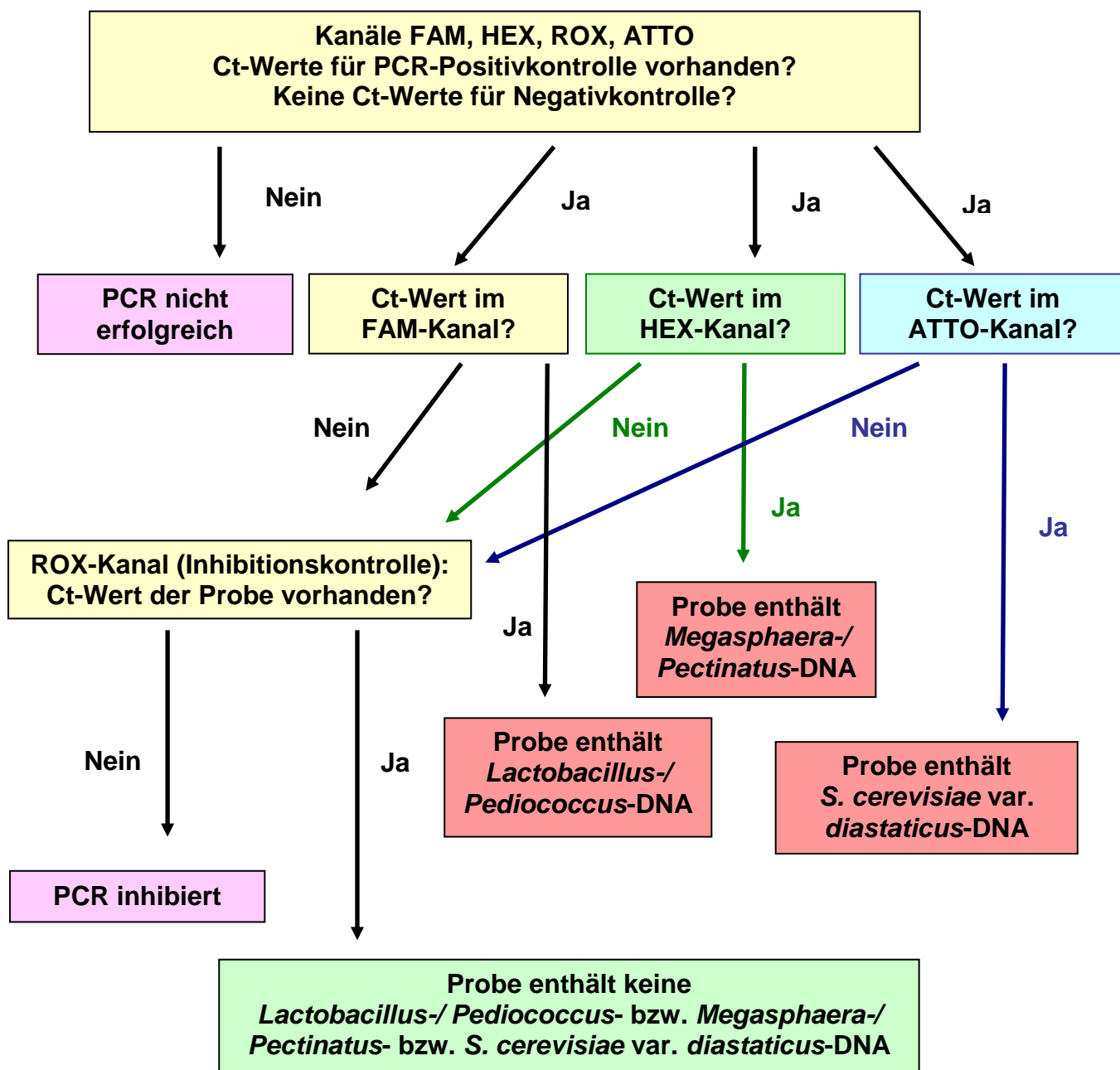
Eine Probe wird als ***Lactobacillen/ Pediococcen* positiv** bewertet, wenn der Ansatz der Probe im **FAM-Kanal** positiv ist und die Negativkontrollen negativ sind. Die Positivkontrollen müssen positiv sein. Die Inhibitionskontrolle im ROX-Kanal kann im Probenansatz positiv oder negativ sein, abhängig von DNA-Menge oder inhibitorischen Komponenten im Reaktionsansatz. In den Negativkontrollen muss sie positiv sein.

Eine Probe wird als ***Megasphaera/ Pectinatus* positiv** bewertet, wenn der Ansatz der Probe im **HEX-Kanal** positiv ist und die Negativkontrollen negativ sind. Die Positivkontrollen müssen positiv sein. Die Inhibitionskontrolle im ROX-Kanal kann im Probenansatz positiv oder negativ sein, abhängig von der DNA-Menge oder inhibitorischen Komponenten im Reaktionsansatz. In den Negativkontrollen muss sie positiv sein.

Eine Probe wird als ***S. cerevisiae* var. *diastaticus* positiv** bewertet, wenn der Ansatz der Probe im **ATTO-Kanal** positiv ist und die Negativkontrollen negativ sind. Die Positivkontrollen müssen positiv sein. Die Inhibitionskontrolle im ROX-Kanal kann im Probenansatz positiv oder negativ sein, abhängig von der DNA-Menge oder inhibitorischen Komponenten im Reaktionsansatz. In den Negativkontrollen muss sie positiv sein.

Eine Probe wird als **negativ** bewertet, wenn keine detektierbare Fluoreszenz in den verschiedenen Kanälen vorliegt und die Positivkontrollen eindeutig positiv sind. Die Negativkontrollen sind eindeutig negativ. Zum Ausschluss falsch negativer Ergebnisse durch inhibitorische Einflüsse muss die Inhibitionskontrolle in der Probe und in den Negativkontrollen positiv sein.

# 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 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

## P1 and *S. cerevisiae* var. *diastaticus* Screening

### 1. Examples of successful detected microorganisms

- *Lactobacillus* spp.
  - L. acetotolerans*
  - L. acidophilus*
  - L. amylolyticus*
  - L. amylovorus*
  - L. backii*
  - L. brevis*
  - L. brevisimilis*
  - L. buchneri*
  - L. casei* / *paracasei*
  - L. collinoides* / *paracollinoides*
  - L. coryniformis* ssp. *coryniformis*
  - L. coryniformis* ssp. *torquens*
  - L. curvatus*
  - L. delbrückii* ssp. *delbrückii*/ *lactis*
  - L. harbinensis*
  - L. helveticus*
  - L. johnsonii*
  - L. lindneri*
  - L. malefermentans*
  - L. parabrevis*
  - L. parabuchneri* (*frigidus*)
  - L. paucivorans*
  - L. pentosus*
  - L. perolens*
  - L. plantarum*
  - L. paraplantarum*
  - L. rossiae*
- *Lactococcus lactis*
- *Megasphaera* spp.
- *Micrococcus kristiniae*
  - *Pectinatus* spp.
    - Pectinatus cerevisiiphilus*
    - Pectinatus frisingensis*
    - Pectinatus haikarae*
    - Pectinatus* ssp.
- *Pediococcus* spp.
  - Pediococcus acidilactici*
  - Pediococcus damnosus*
  - Pediococcus dextrinicus*
  - Pediococcus inopinatus*
  - Pediococcus pentosaceus*
  - Pediococcus parvulus*
  - Pediococcus claussenii*
- *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*

## 2. Intended use

Qualitative detection of bacterial and *S. cerevisiae* var. *diastaticus* contaminations in filtrated beer, beer mixes and yeast containing samples.

## 3. Test principle

The TaqMan® real-time PCR is based on hot-start-PCR and sequence-specific dual labelled probes (FAM/DQ; HEX/DQ; ATTO/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 (ROX/DQ) is amplified together in one reaction vessel 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). **The tubes contain lyticase.**

## 4. 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 <sub>2</sub> O	colourless cap
1 x Control-DNA (freeze-dried)	yellow cap

## 5. Storage conditions

**The Control-DNA is freeze-dried and has to be solved in ddH<sub>2</sub>O prior to use (see 7.1).**

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.

## **6. Materials required, but not provided**

### **6.1. Instruments**

Real-time PCR machine for low profile tubes clear

Standard benchtop mini-centrifuge (1.5 – 2.0 mL vials)

Centrifuge for strips

Pipettes

“Vortex”

### **6.2. Reagents and plastic ware**

sterile ddH<sub>2</sub>O

sterile filter tips

**optional:** Uracil N-Glycosylase (0.01 U/ $\mu$ L added to the PCR reaction)

## 7. PCR

### 7.1. PCR-Setup

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

- add 55  $\mu\text{L}$  sterile ddH<sub>2</sub>O to the freeze-dried Control-DNA
- after 15 minutes mix well

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

PCR-reaction Setup:

PCR-components	volume ( $\mu\text{L}$ )
Premix	15.0
Sample-DNA	5.0*
Total volume	<b>20.0</b>

\* if using the Simplex easy DNA- or QuickGEN Yeast Sample Preparation Kit:  
add 2.5  $\mu\text{L}$  DNA and 2.5  $\mu\text{L}$  sterile ddH<sub>2</sub>O

1. Pipette 15  $\mu\text{L}$  of the Premix into each PCR-tube, making sure that, prior to the first filling, the tip has been moistened.
2. Add 5  $\mu\text{L}$  sample-DNA, add 5  $\mu\text{L}$  of the Control-DNA for the positive control reaction, add 5  $\mu\text{L}$  of the extraction control and 5  $\mu\text{L}$  of ddH<sub>2</sub>O 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 5  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O to avoid unspecific amplification.**

**Work swiftly to avoid warming up and keep away from light.**

## 7.2 PCR-Program

### Note:

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

### 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 30*-35 x
Cycling Annealing/ Elongation	20 sec	63 °C	

**\* for preenriched samples program 30 cycles**

<b>Advanced Settings</b>	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 30*-35 x
Cycling Annealing/ Elongation	30 sec	63 °C	

**\* for preenriched samples program 30 cycles**

<b>Advanced Settings</b>	Integration time (s)	0.5
--------------------------	----------------------	-----

## 8. Evaluation

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

**Lactobacillus/ Pediococcus-DNA:** FAM-channel

**Megasphaera/ Pectinatus-DNA:** HEX-channel

**Inhibition Control-DNA:** ROX-channel

**S. cerevisiae var. diastaticus-DNA:** ATTO-channel

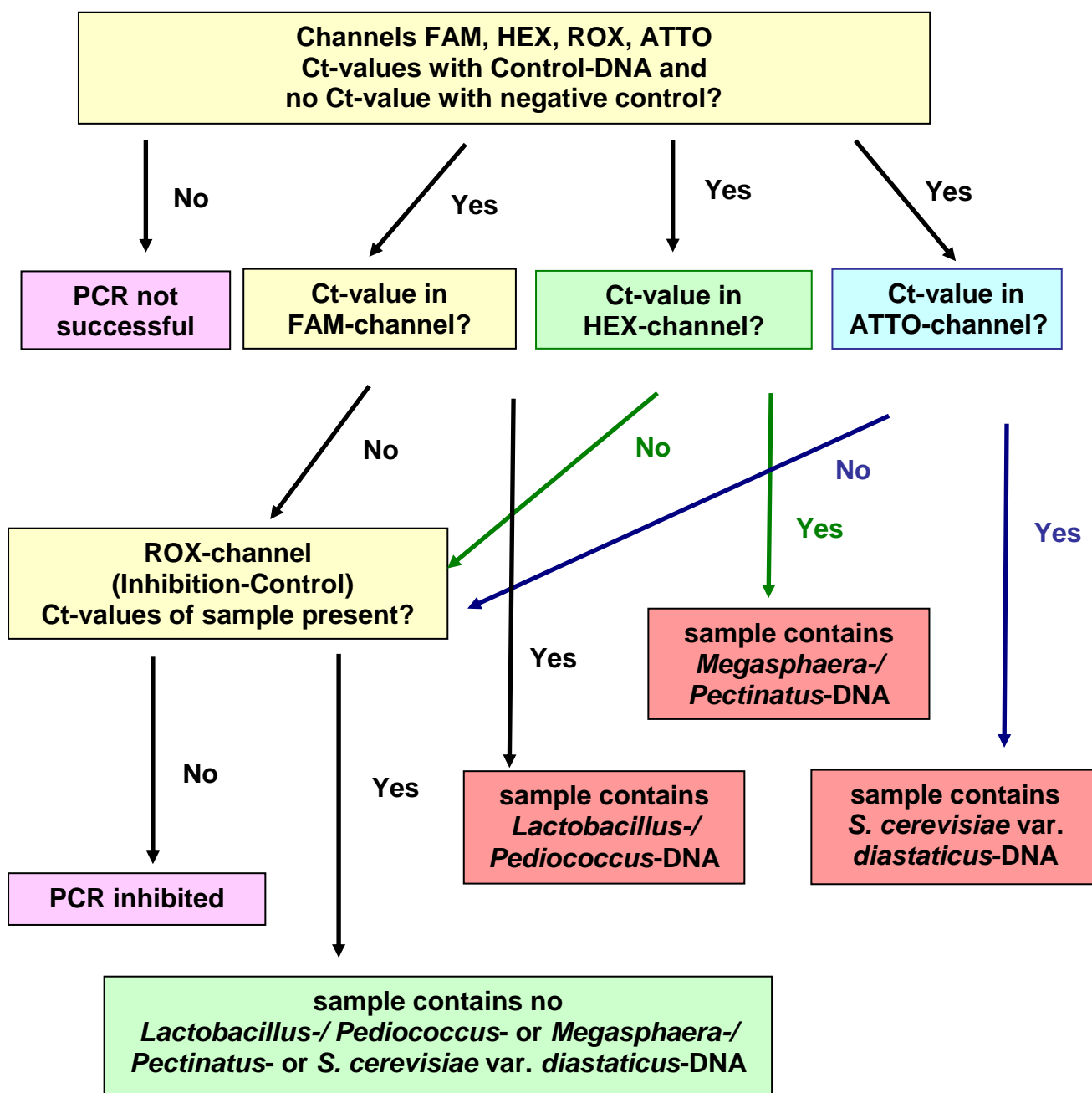
A sample is ***Lactobacillus/ Pediococcus*** positive, if there is a detectable fluorescence increase in the **FAM-channel** and the negative controls show no amplification. The positive controls should have a positive fluorescence signal. The Inhibition Control in the ROX-channel may be positive or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

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

A sample is ***S. cerevisiae var. diastaticus*** positive, if there is a detectable fluorescence increase in the **ATTO-channel** and the negative controls show no amplification. The positive controls should have a positive fluorescence signal. The Inhibition Control in the ROX-channel may be positive or negative (depending on the amount of DNA or inhibitors in the sample reaction). In the negative controls it has to be positive.

A sample is negative, if there is no detectable fluorescence increase in the different channels and the positive controls have a positive fluorescence signal. The negative controls show no amplification. The Inhibition Control in the ROX-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



**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.