



INSTITUT FÜR ANGEWANDTE LABORANALYSEN GMBH

Dekkera bruxellensis quantitative

FAM / HEX

Quantitativer Real-time PCR Nachweis von
Dekkera bruxellensis

Quantitative real-time PCR detection of
Dekkera bruxellensis

REF: Q395

Version 01/20

Dekkera bruxellensis quantitativ

1. Verwendungszweck

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 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.

3. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien können 50 Bestimmungen durchgeführt werden:

1 x Premix	weißer Deckel
1 x Dye Mix (lyophilisiert, inkl. IC-DNA)	dunkles Gefäß, roter Deckel
1 x ddH ₂ O	farbloser Deckel
1 x Control-DNA (Standard 2, <i>D. bruxellensis</i> , lyophilisiert) Standard 2 =20000 Zellen/2,5 µL DNA	gelber Deckel
1 x Solution S (zur Aufnahme der Control-DNA)	grüner Deckel

4. Lagerung

Der Dye Mix wird lyophilisiert geliefert und muss vor Gebrauch in ddH₂O gelöst werden.

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

Den lyophilisierten Dye Mix und die lyophilisierte Control-DNA nicht einfrieren. Die PCR-Reagenzien bei 2 – 8 °C, die gelöste Control-DNA und 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.

Der Dye Mix (roter Verschluss) enthält die fluoreszenzmarkierten Sonden und ist lichtempfindlich. Aus diesem Grund sollte er nicht unnötigem Lichteinfall ausgesetzt werden.

Alle Reagenzien sind bei korrekter Lagerung 6 Monate haltbar.

5. Zusätzlich erforderliches Material

5.1. Geräte

Real-time Gerät mit FAM- und HEX-Kanal

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

Zentrifuge für PCR-Platten oder Strips

Pipetten

„Vortex“

5.2. Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

steriles, doppelt-destilliertes oder deionisiertes Wasser (ddH₂O)

sterile Reaktionsgefäße 1,5 – 2,0 mL

PCR-Platten / Strips incl. Folien / Deckel

passende, sterile Filterspitzen (Filtertips)

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

6. PCR

6.1. PCR-Ansatz

Vor der ersten Benutzung müssen alle lyophilisierten Komponenten kurz zentrifugiert und in ddH₂O bzw. Solution S gelöst werden:

- den lyophilisierten Dye Mix in 80 µL ddH₂O aufnehmen
- die lyophilisierte Control-DNA in 55 µL Solution S aufnehmen
- 30 Minuten lösen lassen, dann gut mischen und kurz zentrifugieren

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

PCR-Ansatz pro Probe:

PCR-Komponenten	Menge (µL)
Premix	16,0
Dye Mix	1,5
Proben-DNA	2,5
Gesamtvolumen	20,0

1. Den Mastermix aus Premix und Dye Mix herstellen.
2. Multipliziere die oben angegebenen Volumina mit der Anzahl PCR-Reaktionsansätze, inklusive aller Kontrollen (Positivkontrolle, Negativkontrolle, Extraktionskontrolle), unter Berücksichtigung einer Pipettierreserve von ca. 5-10 % .
3. Je 17,5 µL Mastermix in die einzelnen PCR-Reaktionsgefäße füllen.
4. 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).
5. Die PCR-Reaktionsgefäße sofort verschließen und kurz zentrifugieren.
6. 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

6.2.1 Programmierung und PCR-Programm LC480

1. Im Fenster **LightCycler 480 Software release 1.5.0. SP1** das Werkzeugsymbol: Schraubenschlüssel in der rechten Leiste anklicken
2. Auf der linken Seite den Button **Detection formats** anklicken
3. Im Fenster **Detection formats New** anklicken und dem Experiment einen Namen geben
4. Im Fenster **Filter Combination Selection** die folgenden Filterkombinationen ankreuzen: 465-510 / 533-580
5. Im Fenster **Selected Filter Combination** List folgende Werte eingeben:

Excitation Filter	Emission Filter	Name	Melt factor	Quant factor	Max. Integ. Time
465	510	465-510 FAM	1	10	2
533	580	533-580 HEX	1	10	2

6. Schließen des Fensters durch Anklicken des Buttons **Close**
7. Auf der rechten Seite Button **New Experiment** anklicken
8. Aus dem pull-down Menü der Leiste **Detection formats** das entsprechende Experiment auswählen, den Button **Customize** anklicken und die Detektionsformate überprüfen. Alle müssen aktiviert sein.
9. Klicken des **OK** buttons
10. Folgendes Programm schreiben:

1. Programm Name: **Heat**

Cycles **1** Analysis Mode **None**

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:15:00	4.40		0	0	0

2. Programm Name: **Ampli**

Cycles **40** Analysis Mode **Quantification**

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.40		0	0	0
63	Single	00:00:35	2.20		0	0	0

3. Programm Name : **Cool**

Cycles **1** Analysis Mode **None**

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:20	2.20		0	0	0

Optional: Einspeichern des Programms als **run template**:

Unten links den Haken neben dem Button **Apply Template** anklicken und **Save as template** abspeichern, Lauf in den **template Ordner** speichern

Für spätere Wiederholungen steht das Programm nun im **New Experiment from template** zur Verfügung.

11. Links den Button **Subset editor** anklicken

12. Den Button **+** anklicken und **New Subset 1** erscheint

13. Mit der Strg Taste die entsprechenden wells im **New Subset 1 Settings** Fenster anklicken

14. Den Button **Apply** anklicken

15. In der linken Leiste den Button **Sample editor** anklicken

16. **Ganz wichtig:** Oben in der Leiste **Step 1 Select Workflow: Abs.Quant** ankreuzen

17. In der Leiste **Step 2 Select Samples** das Subset **New Subset** auswählen

18. Proben in der Tabelle eingeben

19. In der linken Leiste den Button **Experiment** anklicken und mit **Start run** den Lauf starten

6.2.2 PCR-Programm für andere real-time Geräte

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-JOE x4 und FAM x8.

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

Step	Time	Temp.	
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).

Für LC480: Vor der Auswertung die Colour Compensation aktivieren

***Dekkera bruxellensis*-DNA:** FAM-Kanal (LC480: 465-510 nm)

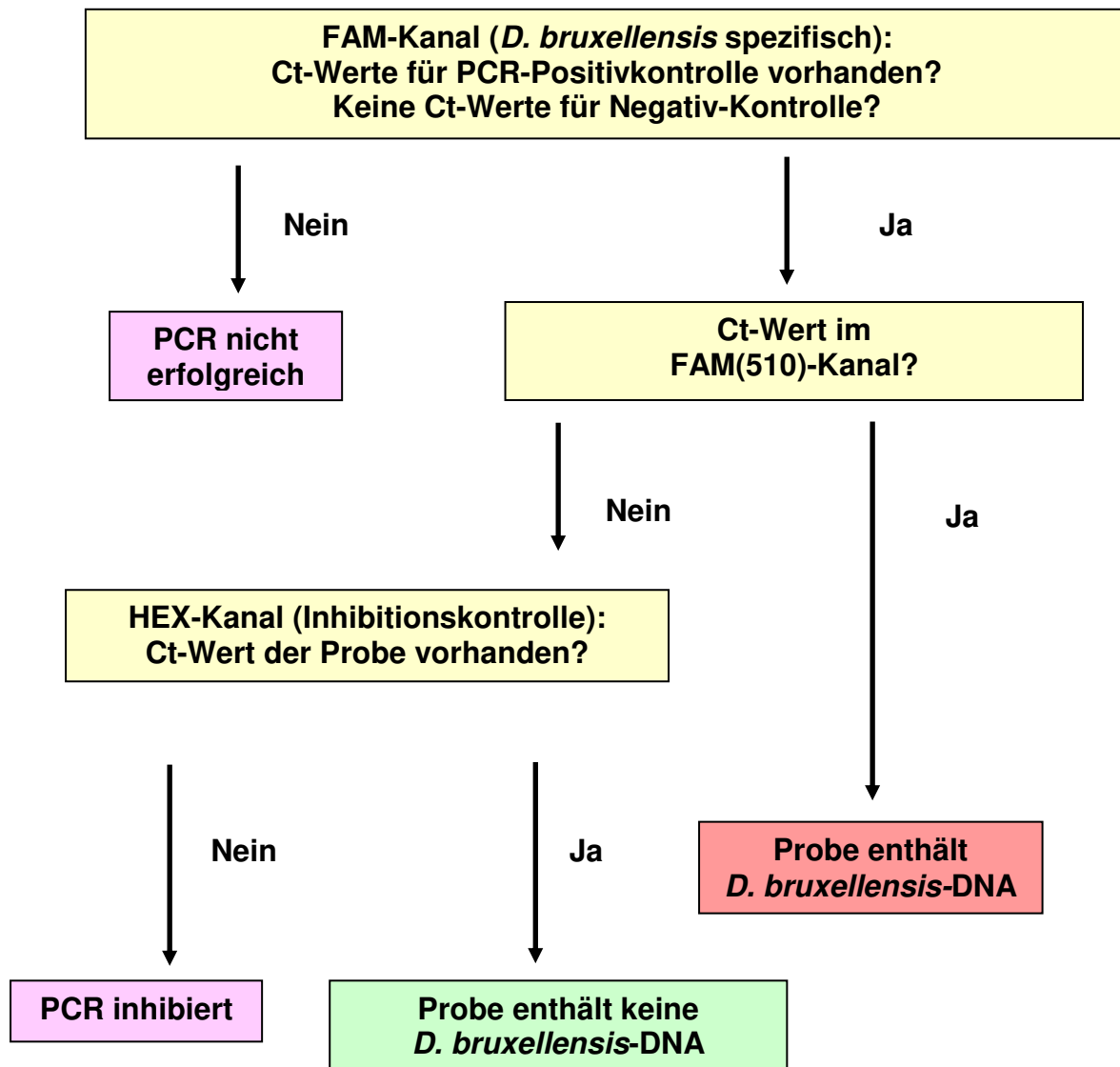
Inhibitionskontroll-DNA: HEX-Kanal (LC480: 533-580 nm)

Eine Probe wird als ***Dekkera bruxellensis* positiv** bewertet, wenn der Ansatz der Probe im **FAM-Kanal (LC480: 465-510 nm)** positiv ist und die Negativkontrollen negativ sind. Die Positivkontrollen müssen positiv sein. Die Inhibitionskontrolle im HEX-Kanal (LC480: 533-580 nm) 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 (LC480: 465-510 nm) negativ ist und die PCR-Positivkontrolle gleichzeitig positiv ist. Die PCR-Negativkontrolle muss im FAM-Kanal (LC480: 465-510 nm) negativ sein. Die Inhibitionskontrolle im HEX-Kanal (LC480: 533-580 nm) muss im Probenansatz positiv sein, um ein falsch negatives Ergebnis durch inhibitorische Effekte auszuschließen.

Analysediagramm

LC480: Auswertung nach ausgewählter Colour Compensation



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.

Dekkera bruxellensis quantitative

1. Intended use

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 at 518 nm (FAM/DQ). 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).

3. Kit contents

The kit contains sufficient reagents for 50 PCR reactions.

1 x Premix	white cap
1 x Dye Mix (freeze-dried, incl. IC-DNA)	dark vial, red cap
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 Dye Mix is freeze-dried, it has to be solved in ddH₂O prior to use.

The freeze-dried Control-DNA has to be solved in Solution S (see 6.1).

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

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

The solved Control-DNA and the Premix should be stored 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 Mix contains the fluorescent labelled probes and should be handled light protected.

All reagents are stable for 6 months, if they are stored correctly.

5. Materials required, but not provided

5.1. Instruments

Real-time PCR instrument with FAM- and HEX-channel

Centrifuge for 1.5 – 2.0 mL reaction tubes

Centrifuge for multiwell plates or stripes

Pipettes

“Vortex”

5.2. Reagents and plastic ware

sterile ddH₂O

sterile reaction vessels 1.5 – 2.0 mL

sterile optical tubes, plates, capillaries

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 kit components have to be shortly centrifuged and carefully resolved in ddH₂O or Solution S:

- add 80 µL sterile ddH₂O to freeze-dried Dye Mix
- add 55 µL Solution S to freeze-dried Control-DNA
- after 30 minutes mix well

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

PCR-reaction per sample:

PCR-components	amount (µL)
Premix	16.0
Dye Mix	1.5
Sample-DNA	2.5
total volume	20.0

1. Prepare a mastermix by mixing Premix and Dye Mix
2. Multiply said volumes with the number of PCR preparations including controls (positive control, negative control, extraction control), taking into account pipette reserves of approximately 5-10 %.
3. Divide 17.5 µL of the PCR-mastermix among the individual reaction vessels, making sure that, prior to the first filling, the tip of the pipette has been moistened.
4. 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.
5. Close the tubes immediately and centrifuge them shortly.
6. 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

6.2.1 PCR-Program LC480

1. Click the button **tool** on the right side in the window **LightCycler 480 Software release 1.5.0. SP1**.
2. Click the button **Detection formats** at the left side of the menu bar.
3. Click **New** in the window **Detection formats** and name the experiment
4. Open the window **Filter Combination Selection** and choose the following filter combinations: 465-510 and 533-580.
5. Open the window **Selected Filter Combination** list and add the following amounts.

Excitation Filter	Emission Filter	Name	Melt factor	Quant factor	Max. Integ. Time
465	510	465-510 FAM	1	10	2
533	580	533-580 HEX	1	10	2

6. **Close** the window.
7. Click the button **New Experiment** on the right side of the menu bar.
8. From the pull-down menu **Detection formats** choose the defined experiment, click the button **Customize** and check the detection formats. All of them have to be activated.
9. Click the button **ok**
10. Define the following program:

1. Programm Name: **Heat**

Cycles **1** Analysis Mode **None**

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:15:00	4.40		0	0	0

2. Programm Name: **Ampli**

Cycles **40** Analysis Mode **Quantification**

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.40		0	0	0
63	Single	00:00:35	2.20		0	0	0

3. Programm Name : **Cool**

Cycles **1** Analysis Mode **None**

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:20	2.20		0	0	0

Optional: Saving the program as **run template**. The template button allows to select and apply a template to the currently open object and to save the currently open object as a template. Click the clamp beside the button **Apply Template**. Click **Save as template** and save the file in **templates**.

11. Click the button **Subset editor** on the left side
12. Click the button + and **New Subset 1** appears
13. Mark the wells in the **New Subset 1 Settings** window
14. Click the button **Apply**
15. Click the button **Sample editor** on the left side
16. **Very important:** Activate In the window **Step 1 Select Workflow: Abs.Quant**
17. Choose the subset **New Subset** in the window **Step 2 Select Samples**
18. Define your probes in the **Sample table**
19. Click the button **Experiment** and start the run with **Start run**

6.2.2 PCR-Program for other real-time machines

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.	
Initial Denaturation of DNA	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.

For LC480: Activate Colour Compensation

***Dekkera bruxellensis*-DNA:** FAM-channel (LC480: 465-510 nm)

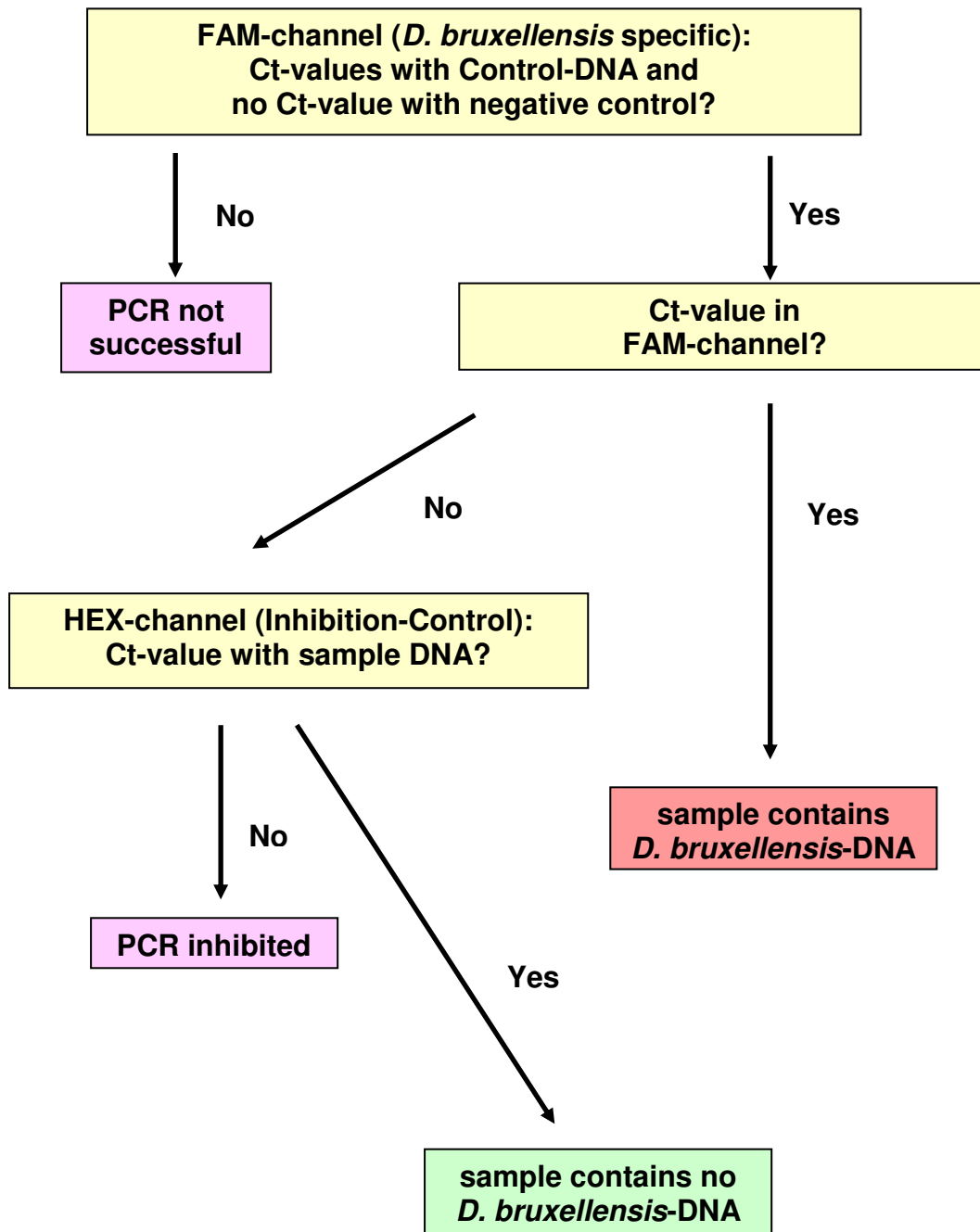
Inhibition Control-DNA: HEX-channel (LC480: 533-580 nm)

A sample is ***Dekkera bruxellensis* positive**, if there is a detectable fluorescence increase in the **FAM-channel (LC480: 465-510 nm)** and the negative controls show no amplification. The positive controls should have a positive fluorescence signal. The Inhibition Control in the HEX-channel (LC480: 533-580 nm) 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 (LC480: 465-510 nm) and the positive controls have a positive fluorescence signal. The negative controls show no amplification in FAM-channel (LC480: 465-510 nm). The Inhibition Control in the HEX-channel (LC480: 533-580 nm) 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

LC480: analysis after activating Colour Compensation



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