



INSTITUT FÜR ANGEWANDTE LABORANALYSEN GMBH

QuickGEN PCR Kit

P1 and Dekkera spp. Screening
- low MG -

Real-time PCR Nachweis von
bierschädlichen Bakterien und *Dekkera spp.*

real-time PCR detection of
beer spoilage bacteria and *Dekkera spp.*

REF: Q094

Version 01/25

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

QuickGEN PCR Kit

P1 und Dekkera spp. 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 kristiniae
 - Pectinatus spp.
 - Pectinatus cerevisiophilus
 - Pectinatus frisingensis
 - Pectinatus haikarae
 - Pectinatus ssp.
 - Pediococcus spp.
 - Pediococcus acidilactici
 - Pediococcus damnosus
 - Pediococcus dextrinicus
 - Pediococcus inopinatus
 - Pediococcus pentosaceus
 - Pediococcus parvulus
 - Pediococcus claussenii
- Dekkera spp.
 - Dekkera anomala
 - Dekkera bruxellensis
 - Dekkera custersiana
 - Dekkera naardenensis
 - Dekkera nanus

2. Verwendungszweck

Nachweis von Bakterien- und *Dekkera spp.* 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. **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 ₂ O	farbloser Deckel
1 x Control-DNA (lyophilisiert)	gelber Deckel

5. Lagerung

Die Control-DNA wird lyophilisiert geliefert und muss vor Gebrauch in ddH₂O 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 Erhalt** 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 (ddH₂O)

passende, sterile Filterspitzen (Filtertips)

7. PCR

7.1. 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 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	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

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 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 5 µL ddH₂O auffüllen, um unspezifische Amplifikationen zu verhindern.

Zügig arbeiten, Lichteinfall und Erwärmung der Ansätze vermeiden.

7.2 PCR-Programm

Software MyGo Pro/ ESR 3.5 / 3.6

Step	Time	Temp.	
Lyticase treatment	15 min	37 °C	
Initial denaturation	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	15 sec	95 °C	Cycle 35*-40 x
Cycling Annealing/ Elongation	30 sec	61 °C	

*** für vorangereicherte Proben 35 Zyklen programmieren**

Advanced Settings MyGo Pro Integration time (s) 0.7

Advanced Settings MyGo Pro ESR Integration time (s) 1.0

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

Dekkera spp.-DNA: ATTO-Kanal

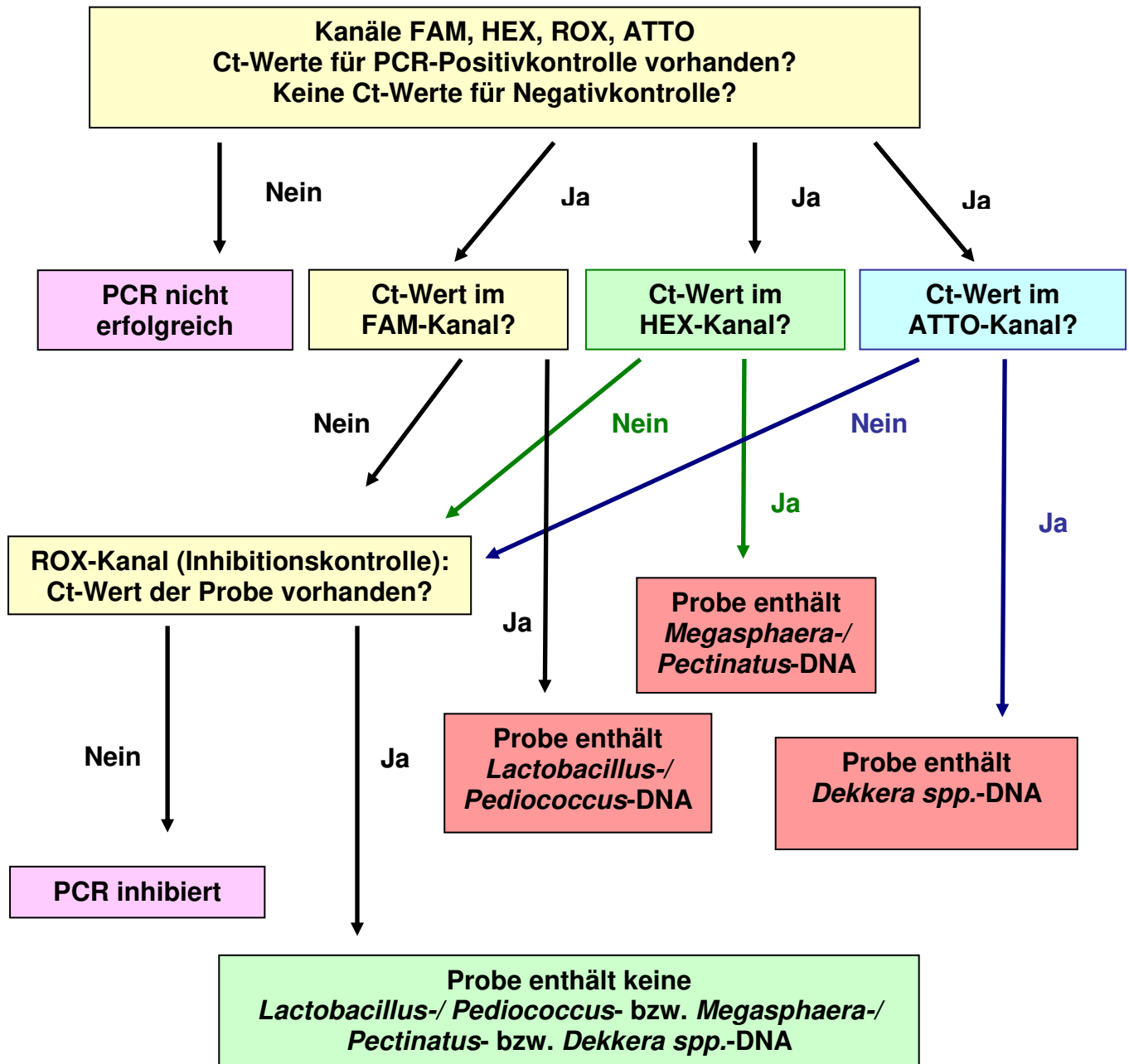
Eine Probe wird als ***Lactobacillen/ Pediococcen*** positiv bewertet, wenn der Ansatz der Probe im **FAM-Kanal** positiv ist und die Negativkontrollen negativ sind. Die Positivkontrollen müssen positiv sein. Die Inhibitionskontrolle im ROX-Kanal kann im Probenansatz positiv oder negativ sein, abhängig 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 ***Dekkera spp.*** 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.

