



INSTITUT FÜR ANGEWANDTE LABORANALYSEN GMBH

QuickGEN PCR Kit

Screening and differentiation of wine spoilers
- white -

Real-time PCR Identifizierung und Differenzierung von
14 weinschädlichen Bakterien und Hefen

real-time PCR detection and differentiation of
14 wine spoilage bacteria and yeast

REF: Q223

Version 01/26

QuickGEN PCR Kit

Screening und Differenzierung von 14 weinschädlichen Bakterien und Hefen

1. Verwendungszweck

Differenzierung von Bakterien und Hefen in Wein (Gattungen und Spezies).
Folgende Bakterien und Hefen werden differenziert:

Lactobacillus spp.

Pediococcus spp.

Essigsäurebakterien

Leuconostoc mesenteroides

Oenococcus oeni

Lactococcus lactis

Alicyclobacillus spp.

Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae var. *diastaticus*

Schizosaccharomyces pombe

<i>Dekkera spp.:</i>	<i>D. anomala</i>
	<i>D. custersiana</i>
	<i>D. bruxellensis</i>
	<i>D. naardenensis</i>
	<i>D. nanus</i>

<i>Candida spp. :</i>	<i>C. albicans</i>
	<i>C. parapsilosis</i>
	<i>C. glabrata</i>
	<i>C. tropicalis</i>
	<i>C. sake</i>
	<i>C. intermedia</i>
	<i>C. pulcherrima</i>

<i>Pichia spp. :</i>	<i>W. anomalus</i>
	<i>P. fermentans</i>
	<i>P. membranaefaciens</i>
	<i>P. guilliermondii</i>

<i>Zygosaccharomyces spp:</i>	<i>Z. bailii</i>
	<i>Z. parabailii</i>
	<i>Z. rouxii</i>

2. Testprinzip

Die Detektion erfolgt mittels Fluoreszenzmessung durch das Hydrolysesondenformat (TaqMan®). Durch hot-start-PCR plus doppelt markierten sequenzspezifischen 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. **In den tubes 5, 6, 7 und 8 ist Lyticase bereits enthalten.**

3. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien können 96 Bestimmungen (12 Proben) durchgeführt werden:

1 x Premix	weißer Deckel
12 x Dye Strips (lyophilisiert, tubes 5, 6, 7 ,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 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.

5. Zusätzlich erforderliches Material

5.1. Geräte

Real-time PCR Gerät für white PCR tubes

Zentrifuge für Strips

Pipetten

„Vortex“

5.2. Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

steriles, doppelt-destilliertes oder deionisiertes Wasser (ddH₂O)

passende, sterile Filterspitzen (Filtertips)

Colour Compensation Set für LC480 (GEN-IAL®, REF: Q800)

LC480: Colour Compensation vor der ersten Benutzung des Kits durchführen

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.

Pipettierbeispiel für einen 8-er Streifen (1 Probe):

Premix vor Gebrauch gut mischen und ggf. kurz abzentrifugieren. Ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß vorbereiten und mit 128 µl Premix bestücken (8.5 x 15.0 µL). Die Folie von den benötigten tube strips entfernen und in Tube 1 des Streifens 5 µL ddH₂O vorlegen und 15 µL Premix aus dem Reaktionsgefäß zupipettieren (NTC). Anschließend 38 µL der entsprechenden Probe in die PCR-tubes pipettieren, kurz vortexen und je 20 µl des Proben-Premixgemisches in die Tubes 2 – 8 pipettieren. Nach dem Pipettieren die tube strips mit den mitgelieferten cap strips verschließen und kurz abzentrifugieren.

PCR-Ansatz pro Probe:

PCR-Komponenten	Menge (µL)
Premix	15,0
Proben-DNA	5,0
Gesamtvolumen	20,0

Pipettierschema:

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

auf die Orientierung der Tubes achten. Vor Tube 1 befindet sich auf dem strip ein A und hinter Tube 8 ein H.

6.2 PCR-Programm

Step	Time	Temp.	Cycle 35 x
Lyticase treatment	15 min	37 °C	
Initial denaturation	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	15 sec	95 °C	
Cycling Annealing/ Elongation	30 sec	63 °C	

6.2.1 PCR-Programm LC 480

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

6. Im Fenster ***Selected Filter Combination*** in der Liste 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
533	610	533-610 610	1	10	2

7. Schließen des Fensters durch Anklicken des Buttons ***Close***
8. Auf der rechten Seite Button **New Experiment** anklicken
9. 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.
10. Klicken des ***OK*** buttons
11. Folgendes Programm schreiben:

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)
37	None	00:15:00	4.40		0	0	0
95	None	00:15:00	4.40		0	0	0

2. Programm Name: ***Ampli***

Cycles 35 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	00:00:15	4.40		0	0	0
63	Single	00:00:30	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.

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

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

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

7. Auswertung

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

LC480: Vor der Auswertung die Colour Compensation aktivieren

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

Die in der Tabelle angegebene Inhibitionskontrolle der Probe (Tube 5) muss im HEX-Kanal positiv sein. Ist die Inhibitionskontrolle im HEX-Kanal negativ, deutet dies auf inhibitorische Komponenten oder einer zu hohen DNA-Menge im Reaktionsansatz hin.

Die in der Tabelle angegebene Positivkontrolle (Tube 8) muss im HEX-Kanal positiv sein. Ist sie im HEX-Kanal negativ, muss die PCR wiederholt werden.

PCR-Auswertung:

auf die Orientierung der Tubes achten. Vor Tube 1 befindet sich auf dem strip ein A und hinter Tube 8 ein H.

	Kanäle	Spezies	Signal
Tube 1	FAM	NTC	negativ
	HEX	Inhibitionskontrolle	positiv
Tube 2	FAM	<i>Lactobacillus spp./ Pediococcus spp.</i>	
	HEX	Essigsäurebakterien	
Tube 3	FAM	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
	HEX	<i>Oenococcus oeni</i>	
Tube 4	FAM	<i>Lactococcus lactis</i>	
	HEX	<i>Alicyclobacillus spp.</i>	
Tube 5	FAM	<i>Candida spp.</i>	
	HEX	Inhibitionskontrolle	positiv
Tube 6	FAM	<i>Dekkera spp.</i>	
	HEX	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Tube 7	FAM	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>	
	HEX	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	
	ROX	<i>Zygosaccharomyces spp.</i>	
Tube 8	FAM	<i>Pichia spp.</i>	
	HEX	PTC	positiv

Beispiel zur Auswertung:

Probe zeigt positives FAM-Signal in Tube 5, dann handelt es sich um *Candida spp.*.
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

Screening and differentiation of 14 wine spoilage bacteria and yeast

1. Intended use

Screening and differentiation of bacteria and yeast in wine (genus and species).
The following yeast are differentiated:

Lactobacillus spp.

Pediococcus spp.

Essigsäurebakterien

Leuconostoc mesenteroides

Oenococcus oeni

Lactococcus lactis

Alicyclobacillus spp.

Saccharomyces cerevisiae

Diastatische Saccharomyces cerevisiae

Schizosaccharomyces pombe

<i>Dekkera spp. :</i>	<i>D. anomala</i>
	<i>D. custersiana</i>
	<i>D. bruxellensis</i>
	<i>D. naardenensis</i>
	<i>D. nanus</i>

<i>Candida spp. :</i>	<i>C. albicans</i>
	<i>C. parapsilosis</i>
	<i>C. glabrata</i>
	<i>C. tropicalis</i>
	<i>C. sake</i>
	<i>C. intermedia</i>
	<i>C. pulcherrima</i>

<i>Pichia spp. :</i>	<i>W. anomala</i>
	<i>P. fermentans</i>
	<i>P. membranaefaciens</i>
	<i>P. guilliermondii</i>

<i>Zygosaccharomyces spp.:</i>	<i>Z.bailii</i>
	<i>Z.parabailii</i>
	<i>Z.rouxii</i>

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. **Tubes 5, 6, 7 und 8 contain lyticase.**

3. Kit contents

The kit contains sufficient reagents for 96 PCR reactions (12 samples):

1 x Premix	white cap
12 x Dye Strips (freeze-dried, tubes 5, 6, 7, 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 arrival**. 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 instrument for white tubes

Centrifuge for strips

Pipettes

“Vortex”

5.2. Reagents and plastic ware

sterile ddH₂O

sterile filter tips

Colour Compensation Set for LC480 (GEN-IAL[®], REF Q800)

LC480: Use a Colour compensation prior to first use of the kit

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.

Pipetting example for an 8-well strip (1 sample):

Mix the premix well before use and centrifuge briefly if necessary. Prepare a sterile 1.5 mL reaction tube and fill it with 128 µL Premix (8.5 x 15.0 µL). Remove the foil from the required tube strips and add 5 µL ddH₂O to tube 1 of the strip and pipette 15 µL premix from the reaction tube (NTC). Then pipette 38 µL of the corresponding sample into the PCR tubes, vortex briefly and pipette 20 µL of the sample premix mixture into each of the tubes 2 - 8. After pipetting, close the tube strips with the cap strips provided and centrifuge briefly.

PCR-reaction Setup:

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

Pipetting schema:

Tube 1*	Premix 15.0 µL	ddH₂O 5.0 µL <u>Attention:</u> pipette no sample-DNA
Tube 2*	Premix 15.0 µL	sample-DNA 5.0 µL
Tube 3*	Premix 15.0 µL	sample-DNA 5.0 µL
Tube 4*	Premix 15.0 µL	sample-DNA 5.0 µL
Tube 5*	Premix 15.0 µL	sample-DNA 5.0 µL
Tube 6*	Premix 15.0 µL	sample-DNA 5.0 µL
Tube 7*	Premix 15.0 µL	sample-DNA 5.0 µL
Tube 8*	Premix 15.0 µL	sample-DNA 5.0 µL

*please notice the orientation of the tubes. They are marked on the strip at Tube 1 with an A and at Tube 8 with an H.

6.2 PCR-Program

Step	Time	Temp.	
Lyticase treatment	15 min	37 °C	
Initial denaturation of DNA	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	15 sec	95 °C	Cycle 35x
Cycling Annealing/ Elongation	30 sec	63 °C	

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 / 533-580 / 533-610

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
533	610	533-610 610	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)
37	None	00:15:00	4.40		0	0	0
95	None	00:15:00	4.40		0	0	0

2. Programm Name: **Ampli**

Cycles **35** 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	00:00:15	4.40		0	0	0
63	Single	00:00:30	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. Switch to the button **Experiment** and start the run with the button **start run**

7. Evaluation

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

LC480: For analysis activate Colour Compensation

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

The Inhibition Control (Tube 5) has to be positive in the HEX-channel. Is the Inhibition Control in the HEX-channel negative inhibitors or high amount of DNA are in the sample reaction.

The Positive Control (Tube 8) has to be positive in the HEX-channel. If it is negative, PCR has to be repeated.

PCR-Analysis:

please notice the orientation of the tubes. They are marked on the strip at Tube 1 with an A and at Tube 8 with an H.

	Kanäle	Spezies	Signal
Tube 1	FAM	NTC	negativ
	HEX	Inhibitionskontrolle	positiv
Tube 2	FAM	<i>Lactobacillus spp. / Pediococcus spp.</i>	
	HEX	Essigsäurebakterien	
Tube 3	FAM	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
	HEX	<i>Oenococcus oeni</i>	
Tube 4	FAM	<i>Lactococcus lactis</i>	
	HEX	<i>Alicyclobacillus spp.</i>	
Tube 5	FAM	<i>Candida spp.</i>	
	HEX	Inhibitionskontrolle	positiv
Tube 6	FAM	<i>Dekkera spp.</i>	
	HEX	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Tube 7	FAM	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>	
	HEX	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	
	ROX	<i>Zygosaccharomyces spp.</i>	
Tube 8	FAM	<i>Pichia spp.</i>	
	HEX	PTC	positiv

Example for interpretation:

If sample shows a positive FAM-signal in Tube 5, *Candida spp.* 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.