



INSTITUT FÜR ANGEWANDTE LABORANALYSEN GMBH

Simplex[®] Easy Wine

DNA-Extraktion von
Mikroorganismen aus Wein und Most

DNA-extraction
of microorganisms in wine and grape must



REF: Q300

Version 07/26

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

Simplex[®] Easy Wine

1. Verwendungszweck

Schnelle und zuverlässige Extraktion von Mikroorganismen-DNA aus Wein und Most

2. Packungsinhalt

Das Kit enthält Reagenzien für 100 Präparationen bzw. 10 Extraktionen:

1 x Easy-Reagent (10 mL – 100 rxn; 1 mL – 10 rxn)

1 x Wine Solution

1 x Washing Solution

3. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

3.1 Geräte:

Heizblock oder Wasserbad, 37 °C – 95 °C

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

Pipetten

“Vortex”

3.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien:

safe-lock Reaktionsgefäße 1,5 – 2,0 mL

passende, sterile Filterspitzen

Einweghandschuhe

Lyticase (DNA- und RNA frei)

4. Vorsichtsmaßnahmen

Grundsätzlich vorsichtiger Umgang mit Chemikalien. Nicht einatmen oder verschlucken. Haut- und Augenkontakt vermeiden.

5. Lagerung

Alle Reagenzien bei Raumtemperatur lagern.

6. Anzeichen für Reagenzienverfall

Bei korrekter Handhabung keine bekannt.

7. Vorbereitungen

Lyticase Lösung herstellen:

5U / μ L in Lyticasepuffer (50 % 1 x TE + 50 % Glycerol, pH 7.5 - 8.0).

Nach Herstellung bei -20 °C lagern.

Easy-Reagent Wine solution herstellen:

Vor der ersten Benutzung den gesamten Inhalt der Wine Solution (violetter Deckel) in die **Easy-Reagent** Lösung geben und gut mischen. Anschließend das Etikett "**Easy- Reagent Wine**" aufkleben. Der entstandene Puffer ist für 4 Monate bei Raumtemperatur stabil.

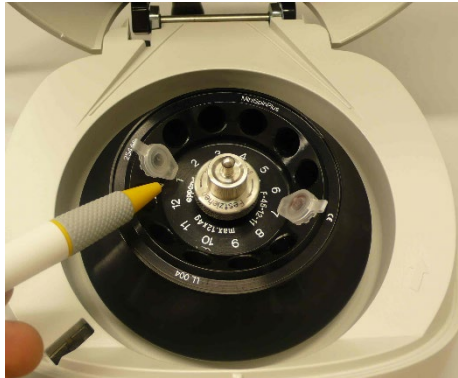
Ist die Washing Solution trübe oder gefroren, die Lösung einige Minuten bei 45 °C erwärmen.

8. DNA-Extraktion

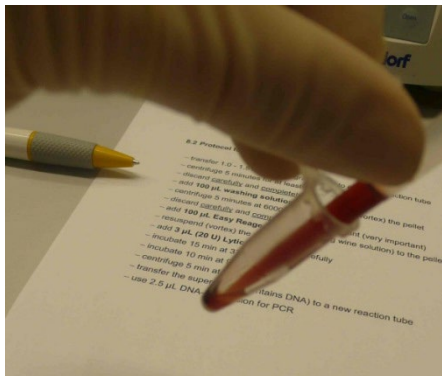
8.1 DNA-Extraktion aus Hefen

Protokoll für 1 mL Wein oder Most

1. die Probe gut mischen und 1,0 mL in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß geben
2. die Reaktionsgefäße immer in der gleichen Ausrichtung in die Zentrifuge stellen, so dass selbst bei nicht sichtbarem Pellet die Position des Pellets bekannt ist



3. 5 min. bei 6000 x g zentrifugieren
4. den Überstand vorsichtig und vollständig immer von der gegenüberliegenden Seite zum Pellet abziehen



5. das Pellet vollständig in **100 µL Washing Solution** resuspendieren (vortexen oder pipettieren)
6. 5 min. bei 6000 x g zentrifugieren
7. den Überstand vorsichtig und vollständig abziehen (**sehr wichtig!**)
Optional: ist der Überstand nach dem Waschschrift noch stark rot gefärbt, die Waschschritte 1-2 mal wiederholen (5.-7.)
8. **100 µL Easy-Reagent Wine** (enthält die Wine Solution) zum Pellet geben
9. das Pellet vollständig resuspendieren (vortexen oder pipettieren)
10. **3 µL (15 U) Lyticase** hinzugeben und gut mischen

11. 15 min. bei 37 °C +/- 1°C inkubieren
12. 10 min. bei 95 °C +/- 1 °C inkubieren
13. 5 min. bei 12000 x g zentrifugieren
14. den Überstand (enthält DNA) in ein neues 1,5 mL safe-lock Reaktionsgefäß überführen (**Achtung**: keine Reste aus dem Pellet mitüberführen)
15. 2,5 µL DNA in die PCR einsetzen

8.2 DNA-Extraktion aus Bakterien und Hefen mittels differentieller Zentrifugation

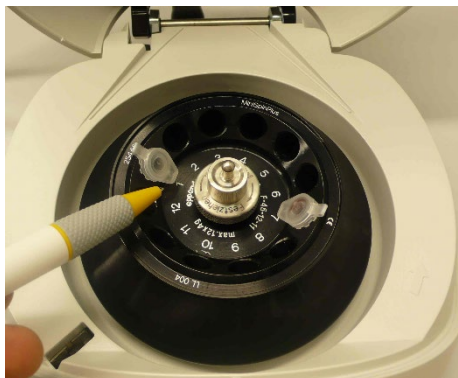
Protokoll für 1 mL Wein oder Most

Stark hefehaltige Proben sollten zuerst sequenziell zentrifugiert werden:

Dazu 1,5 mL Probe für 5 min. bei 400 x g zentrifugieren. 1 mL des Überstandes (enthält die Bakterien) in ein 1,5 mL safe-seal Reaktionsgefäß überführen und nach Protokoll a weiterverarbeiten. Zur **Hefe DNA-Extraktion aus dem Pellet** nach Protokoll b weiterarbeiten.

Protokoll a Bakterien:

1. die Reaktionsgefäße immer in der gleichen Ausrichtung in die Zentrifuge stellen, so dass selbst bei nicht sichtbarem Pellet die Position des Pellets bekannt ist



2. 5 min. bei 12000 x g zentrifugieren
3. das Pellet vollständig in **100 µL Washing Solution** resuspendieren (vortexen oder pipettieren)
4. 5 min. bei 12000 x g zentrifugieren
5. den Überstand vorsichtig und vollständig abziehen (**sehr wichtig!**) und verwerfen
Optional: ist das Pellet nach dem Waschschrift noch stark rot gefärbt, die Waschritte 1-2 mal wiederholen (5.-7.)
6. **100 µL Easy-Reagent Wine** (enthält die Wine solution) zum Pellet geben
7. das Pellet vollständig resuspendieren (vortexen oder pipettieren);
8. 5 min. bei 12000 x g zentrifugieren
9. den Überstand (enthält DNA) in ein neues 1,5 mL safe-lock Reaktionsgefäß überführen (**Achtung**: keine Reste aus dem Pellet mitüberführen)
10. 2,5 µL DNA in die PCR einsetzen

Protokoll b Hefen:

1. das Pellet vollständig in **100 µL Washing Solution** resuspendieren (vortexen oder pipettieren)
2. 5 min. bei 12000 x g zentrifugieren
3. den Überstand vorsichtig und vollständig abziehen (**sehr wichtig!**) und verwerfen
Optional: ist das Pellet nach dem Waschschrift noch stark rot gefärbt, die Waschrunde 1-2 mal wiederholen (5.-7.)
4. **100 µL Easy-Reagent Wine** (enthält die Wine solution) zum Pellet geben
5. das Pellet vollständig resuspendieren (vortexen oder pipettieren)
6. **3 µl (15 U) Lyticase** hinzugeben und gut mischen
7. 15 min. bei 37 °C +/- 1°C inkubieren
8. 10 min. bei 95 °C +/- 1°C inkubieren
9. 5 min. bei 12000 x g zentrifugieren
10. den Überstand (enthält DNA) in ein neues 1,5 mL safe-lock Reaktionsgefäß überführen
(**Achtung:** keine Reste aus dem Pellet mitüberführen)
11. 2,5 µL DNA in die PCR einsetzen

Simplex[®] Easy Wine

1. Intended use

Fast and optimal DNA-extraction from microorganisms in wine samples and grape must

2. Content

The kit contains sufficient reagents for 100 or 10 extractions:

1 x Easy-Reagent (10 mL – 100 rxn; 1 mL – 10 rxn)

1 x Wine Solution

1 x Washing Solution

3. Materials required but not provided

3.1 Instruments

Heating block or water bath 37 °C – 95 °C (98.6 - 203 °F)

Microcentrifuge for 1.5 – 2.0 mL reaction tubes

Pipettes

“Vortex”

3.2 Reagents and plastic ware

safe-lock reaction tubes 1.5 – 2.0 mL

suitable filter tips

single use gloves

Lyticase (Sigma without DNA and RNA)

4. Warnings

Careful use with personal protection according to good laboratory practice is recommended. Do not incorporate. Avoid skin and eye contact with all solutions.

5. Storage

Store the kit at room temperature.

6. Indications of deterioration of reagents

In case of accurate handling deterioration unknown.

7. Preliminary preparations

Prepare Lyticase stock solution:

5U / μ L in lyticase buffer (50 % 1xTE + 50 % Glycerol, pH 7.5 - 8.0).

Store solution at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($-4\text{ }^{\circ}\text{F}$)

Prepare Easy-Reagent Wine solution:

Before first use add the total content of the Wine Solution (violet cap) to the Easy-Reagent and mix well. Please paste up the enclosed sticker "**Easy-Reagent Wine**". The resulting buffer is stable for 4 months at room temperature.

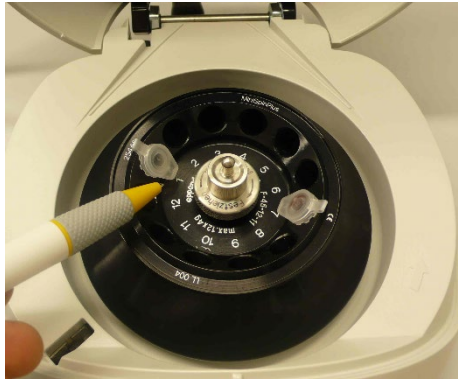
If the Washing Solution is turbid or frozen incubate the solution some minutes at $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($113\text{ }^{\circ}\text{F}$) till it is clear.

8. DNA Extraction

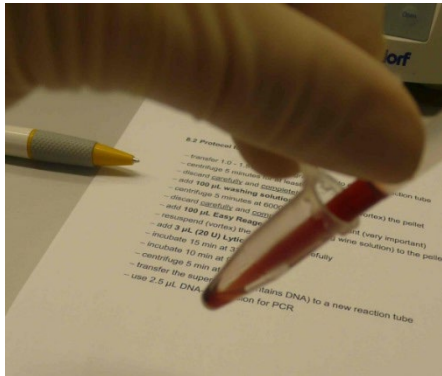
8.1 DNA-Extraction from yeast

Protocol for 1 mL wine or grape must

1. mix the sample and transfer 1.0 mL to a 1.5 mL safe-lock reaction tube
2. place the tubes always in the same manner into the centrifuge (lid of the tube), so that even when no pellet will be visible, it will be clear where the cells/pellet will be



3. centrifuge 5 minutes for at least 6000 x g
4. discard carefully and completely the supernatant. Aspirate from the opposite side of the pellet



5. resuspend the pellet completely in **100 μ L Washing Solution** (vortex or pipetting)
6. centrifuge 5 minutes at 6000 x g
7. discard carefully and completely the supernatant (**very important**)
Optional: if the pellet shows after the washing step strong red flavour, repeat the washing step once or twice (5.-7.)
8. add **100 μ L Easy-Reagent Wine** (including Wine solution) to the pellet
9. resuspend the pellet completely (vortex or pipetting)
10. add **3 μ L (15 U) Lyticase** and mix carefully
11. incubate 15 min at 37 °C +/- 1°C (98,6 °F +/- 1,8 °F)
12. incubate 10 min at 95 °C +/- 1°C (203 °F +/- 1,8 °F)

13. centrifuge 5 min at 12000 x g
14. transfer the supernatant (contains DNA) to a new 1.5 mL safe-lock tube
Attention: transfer no pellet
15. use 2.5 μ L DNA-suspension for PCR

8.2 DNA-Extraction from bacteria and yeast by differential centrifugation

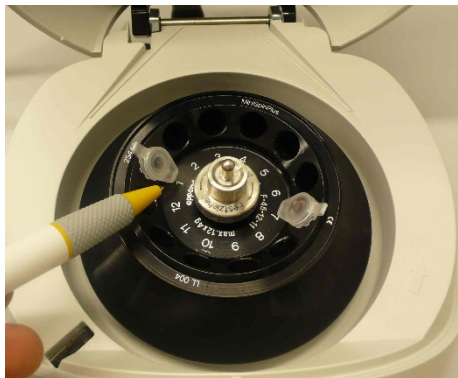
Protocol for 1 mL wine or grape must

Samples with a high yeast content should first be centrifuged in stages:

To do this, centrifuge 1.5 mL of sample for 5 minutes at 400 x g. Transfer 1 mL of the supernatant (containing the bacteria) to a 1.5 mL Safe-Seal reaction tube and proceed according to protocol a. To extract yeast DNA from the pellet, proceed according to protocol b.

Protocol a bacteria:

1. place the tube always in the same manner into the centrifuge (lid of the tube), so that even when no pellet will be visible, it will be clear where the cells/pellet will be



2. centrifuge 5 min at 12000 x g
3. **resuspend** the pellet completely in **100 μ L Washing Solution** (vortex or pipetting)
4. centrifuge 5 min at 12000 x g
5. discard carefully and completely the Washing Solution (**very important**)
optional: if the pellet shows after the washing step strong red flavour, repeat the washing step once or twice (5.-7.)
6. add **100 μ L Easy-Reagent Wine** to the pellet (including Wine Solution)
7. resuspend (vortex) the pellet completely
8. centrifuge 5 min at 12000 x g
9. transfer the supernatant (contains DNA) to a new 1.5 mL safe-lock reaction tube
Attention: transfer no pellet
10. use 2.5 μ L DNA-suspension for PCR

Protocol b yeast:

1. resuspend the pellet completely in **100 µL Washing Solution** (vortex or pipetting)
2. centrifuge 5 min. at 12000 x g
3. discard carefully and completely the Washing solution (**very important**)
optional: if the pellet shows after the washing step strong red flavour, repeat the washing step once or twice (5.-7.)
4. add **100 µl Easy-Reagent Wine** (including Wine Solution) to the pellet
5. resuspend the pellet completely
6. add **3 µl (15 U) Lyticase** and mix well
7. incubate 15 min at 37 °C +/- 1°C (98,6 °F +/- 1,8 °F)
8. incubate 10 min at 95 °C +/- 1°C (203 °F +/- 1,8 °F)
9. centrifuge 5 min at 12000 x g
10. transfer the supernatant (contains DNA) to a new 1.5 mL safe-lock reaction tube
Attention: transfer no pellet
11. use 2.5 µl DNA-suspension for PCR