INSTITUT FÜR **A**NGEWANDTE **L**ABORANALYSEN GMBH

QuickGEN PCR Kit

Wine Screening without yeast

- low -

Real-time PCR-Nachweis weinschädlicher Bakterien

real-time PCR detection of wine spoilage bacteria

REF: Q332

Version 01/26

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

QuickGEN PCR Kit

Wine Screening ohne Hefen

1. Verwendungszweck

Qualitativer Nachweis von *Lactobacillen, Pediococcen, Oenococcus oeni* und Essigsäurebakterien in Wein und Most.

2. Testprinzip

Die Detektion erfolgt durch 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 Extensions-Phase ein messbares Fluoreszenzsignal definierter Wellenlänge emittiert. Eine Inhibitionskontrolle (CY5/DQ) wird zusammen mit der spezifischen Sequenz in einem Reaktionsgefäß amplifiziert, um falsch negative Ergebnisse durch Inhibition auszuschließen.

3. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien können 48 Bestimmungen durchgeführt werden:

1 x Premix	weißer Deckel
6 x Dye Strips (lyophilisiert, inkl. IC-DNA)	tube strips
6 x Cap Strips	
1 x ddH_2O	farbloser Deckel
1 x Solution S	grüner Deckel
1 x Control-DNA (lyophilisiert)	gelber Deckel

4. Lagerung

Die Control-DNA wird lyophilisiert geliefert und muss vor Gebrauch in Solution S gelöst werden (siehe Punkt 6.1).

Die lyophilsierten 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.

5. Zusätzlich erforderliches Material

5.1. Geräte

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

5.2. Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

steriles, doppelt-destilliertes oder deionisiertes Wasser (ddH_2O)
passende, sterile Filterspitzen (Filtertips)

6. PCR

6.1. PCR-Ansatz

Vor der ersten Benutzung muss die lyophilisierte Control-DNA kurz zentrifugiert und gelöst werden:

- die lyophilisierte Control-DNA in 55 µL Solution S aufnehmen
- 15 Minuten lösen lassen und gut mischen

Alle PCR-Komponenten vor Gebrauch gut mischen und 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.

PCR-Ansatz:

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

* bei Verwendung des Simplex Easy Wine Kits: 2,5 µL DNA einsetzen und 2,5 µL steriles ddH_2O 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_2O 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_2O auffüllen, um unspezifische Amplifikationen zu verhindern.

Zügig arbeiten, Lichteinfall und Erwärmung der Ansätze vermeiden.

6.2 PCR-Programm

Step	**Time**	**Temp.**	
Initial denaturation	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	15 sec	95 °C	Cycle 40 x
Cycling Annealing/ Elongation	25 – 30* sec	58 °C	

*** wenn das PCR-Gerät eine Programmierung von 25 sec zulässt, dann bitte diese Zeit einstellen**

7. Auswertung

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

Lactobacillus- / Pediococcus-DNA: FAM-Kanal
***Oenococcus oeni*-DNA:** HEX-Kanal
Essigsäurebakterien-DNA: ROX-Kanal
Inhibitionskontroll-DNA: CY5-Kanal

Eine Probe wird als ***Lactobacillus/ Pediococcus*** 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 CY5-Kanal kann im Probenansatz positiv oder negativ sein, abhängig von DNA-Menge oder inhibitorischen Komponenten im Reaktionsansatz. In den Negativkontrollen muss sie positiv sein.

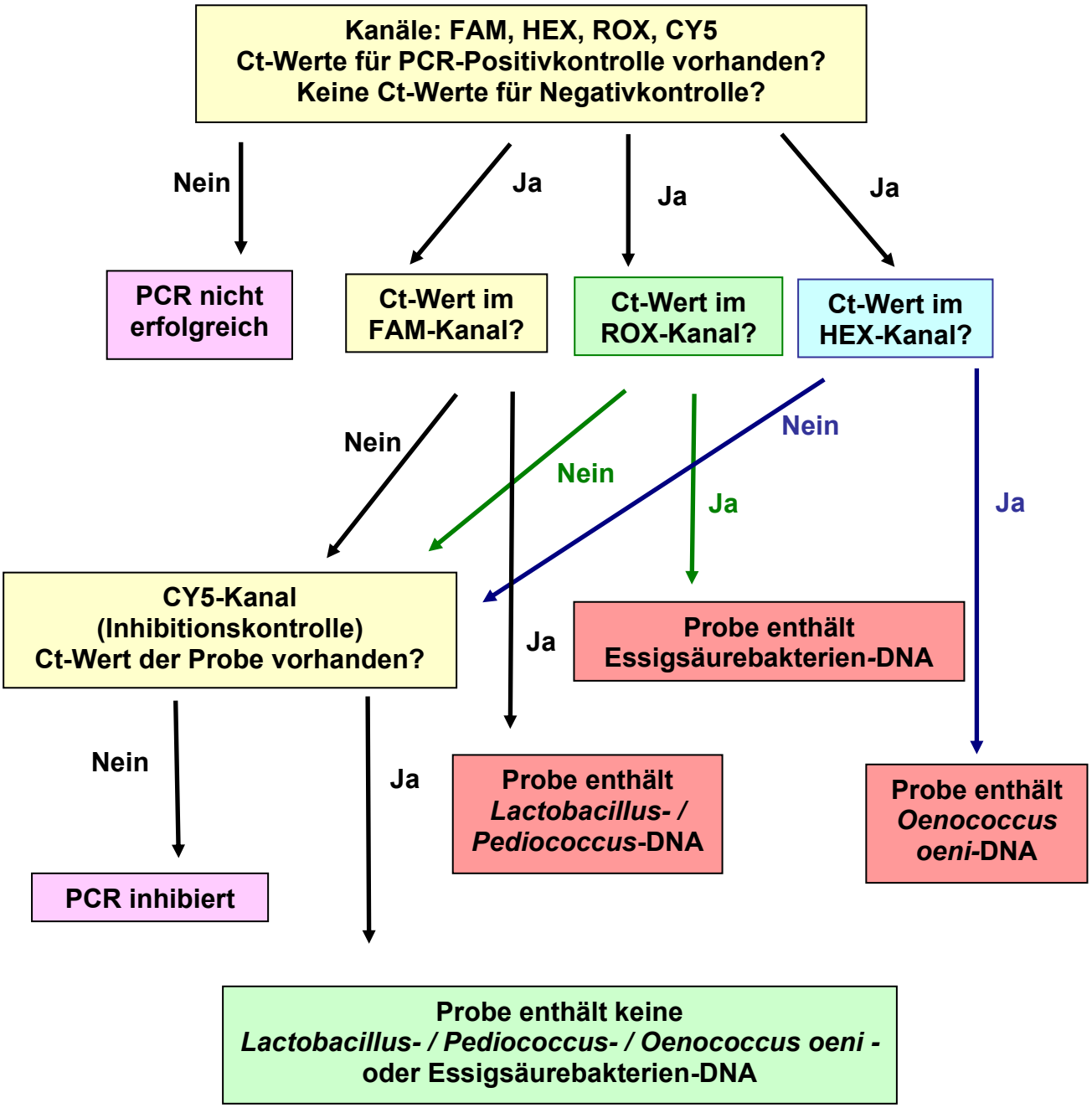
Eine Probe wird als ***Oenococcus oeni*** positiv bewertet, wenn der Ansatz der Probe im **HEX-Kanal** positiv ist und die Negativkontrollen negativ sind. Die Positivkontrollen müssen positiv sein. Die Inhibitionskontrolle im CY5-Kanal kann im Probenansatz positiv oder negativ sein, abhängig von DNA-Menge oder inhibitorischen Komponenten im Reaktionsansatz. In den Negativkontrollen muss sie positiv sein.

Eine Probe wird als **Essigsäurebakterien** *positiv* bewertet, wenn der Ansatz der Probe im **ROX-Kanal** positiv ist und die Negativkontrollen negativ sind. Die Positivkontrollen müssen positiv sein. Die Inhibitionskontrolle im CY5-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 im CY5-Kanal positiv sein.

.

Analysediagramm



Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und dere Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung f einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. GEN-IAL übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität d Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten a der Nutzung der Produkte entstehen nicht. Rechtlicher Hinweis: Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist patentrechtlich geschützt ur somit lizenzpflichtig. Sie ist im Besitz der Hoffman-La Roche Inc. Diese Produktinformation versteht sich nicht als Autorisierung od Lizenzierung, die PCR-Methode kommerziell anzuwenden.

QuickGEN PCR Kit

Wine Screening without yeast

1. Intended use

Qualitative detection of Lactobacilli, Pediococci, *Oenococcus oeni* and acetic acid bacteria in wine and grape must.

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 (CY5/DQ) is amplified together in one reaction vessel with the specific sequence.

3. Kit contents

The kit contains sufficient reagents for 48 PCR reactions:

1	x Premix	white cap
6	x Dye Strips (freeze-dried, incl. IC-DNA)	tube strips
6	x Cap Strips	
1	x ddH_2O	colourless cap
1	x Solution S	green cap
1	x Control-DNA (freeze-dried)	yellow cap

4. Storage

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

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 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 low profile tubes
Centrifuge for 1.5 – 2.0 mL reaction tubes
Centrifuge for strips
Pipettes
“Vortex”

5.2. Reagents and plastic ware

sterile ddH_2O
sterile filter tips

6. PCR

6.1. 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 µL sterile Solution S to the freeze-dried Control-DNA
- after 15 minutes mix well

Before every use thoroughly mix all PCR-components 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.

PCR-reaction Setup:

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

* if using the Simplex Easy Wine Kit: add 2.5 µL DNA and 2.5 µL sterile ddH_2O

1. Pipette 15 µL of the Premix into each PCR-tube, making sure that, prior to the first filling, the tip has been moistened.
2. Add 5 µL sample DNA, for the PCR positive control, add 5 µL of the Control-DNA, add 5 µL of the extraction control and 5 µL of ddH_2O 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 µL ddH_2O to avoid unspecific amplification.

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

6.2 PCR-Program

Step	**Time**	**Temp.**	
Initial denaturation	15 min	95 °C	
Cycling Denaturation	15 sec	95 °C	Cycle 40 x
Cycling Annealing/ Elongation	25 – 30* sec	58 °C	

***please program 25 sec, if the real-time-PCR machine allows it**

7. Evaluation

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

Lactobacillus- / Pediococcus-DNA: FAM-channel
Oenococcus oeni*-DNA*: HEX-channel
Acetic acid bacteria-DNA: ROX-channel
Inhibition Control-DNA: CY5-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 CY5-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.

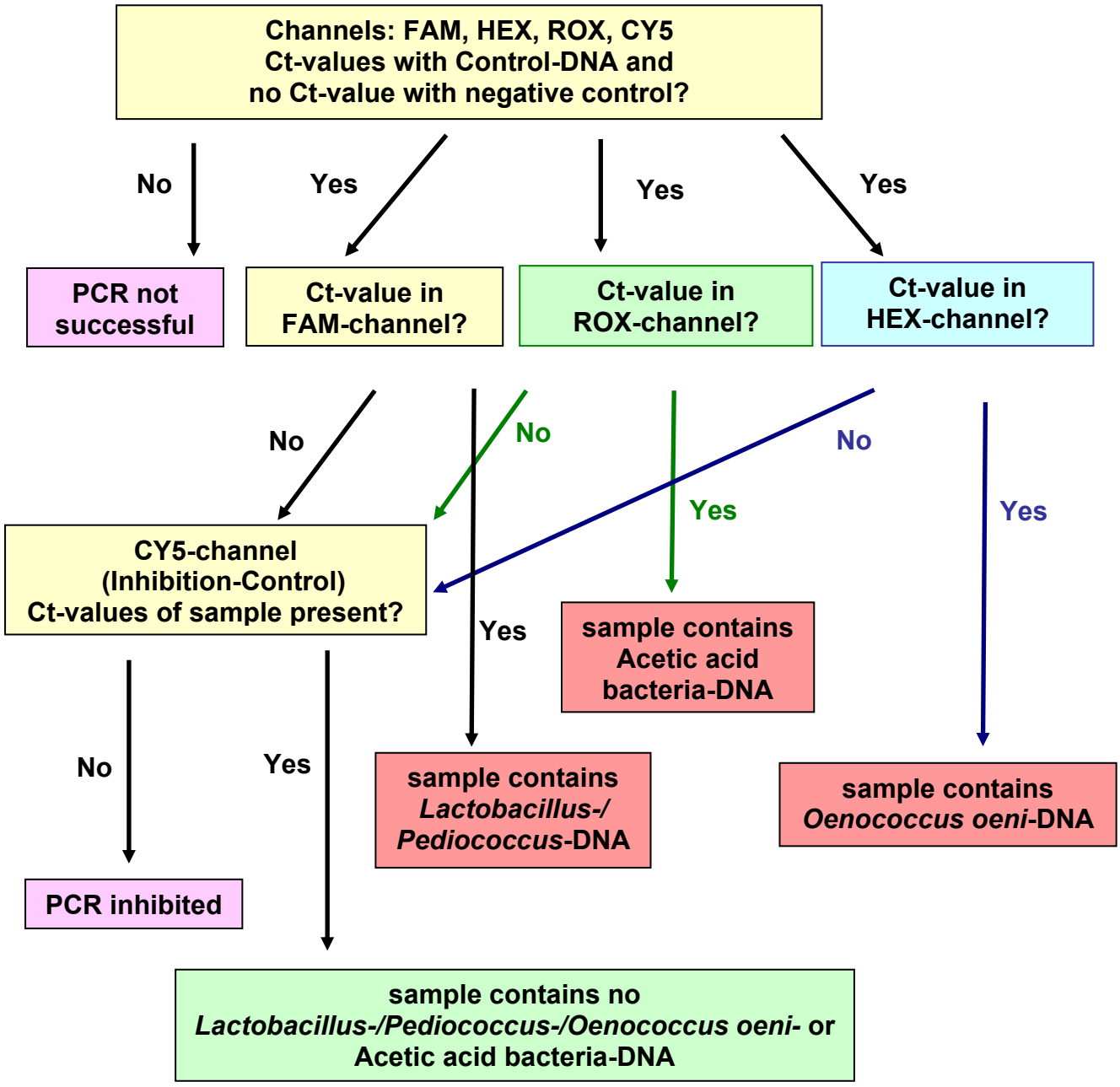
A sample is ***Oenococcus oeni*** positive, if there is a detectable fluorescence increase in the **HEX-channel** and the negative controls show no amplification. The positive controls should have a positive fluorescence signal. The Inhibition Control in the CY5-channel may be positive or negative (depending on the amount of DNA or inhibitors in the sample reaction). In the negative controls it has to be positive.

A sample is **Acetic acid bacteria** positive, if there is a detectable fluorescence increase in the **ROX-channel** and the negative controls show no amplification. The positive controls should have a positive fluorescence signal. The Inhibition Control in the CY5-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 CY5-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.