



INSTITUT FÜR ANGEWANDTE LABORANALYSEN GMBH

Dekkera bruxellensis Standard DNA

200000 cfu

DNA Standard zur Quantifizierung von *Dekkera bruxellensis*

DNA standard for quantification of *Dekkera bruxellensis*

REF: Q360

Version 01/26

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

Dekkera bruxellensis Standard DNA

1. Verwendungszweck

Quantifizierung von *Dekkera bruxellensis* in Getränken (z.B. Wein und Most) durch die real-time PCR (Polymerase Kettenreaktion) Methode.

2. Testprinzip

Die Standard DNA enthält 200000 cfus / 2,5 µL PCR-Reaktion. Er wird zusammen mit den *Dekkera bruxellensis* PCR-Kits (Q395, Q371 – Q373) verwendet. Zur Konzentrationsbestimmung von *Dekkera bruxellensis* in einer Probe wird die **Standard DNA** zur Erstellung einer Standardreihe verdünnt (z.B. 1:10). Die Detektion erfolgt mittels Fluoreszenzmessung durch das Hydrolysesondenformat (TaqMan®) in weniger als zwei Stunden. Durch *Hotstart*-PCR plus einer doppelt markierten sequenzspezifischen Sonde wird bei korrekter Hybridisierung an die Zielsequenz in der Extensions-Phase ein messbares Fluoreszenzsignal definierter Wellenlänge emittiert.

3. Packungsinhalt

Standard 1 enthält DNA für 40 Reaktionen

- | | | |
|-----|--|---------------|
| 1 x | Standard 200000 cfus/ 2,5 µL DNA (<i>D. bruxellensis</i> , lyophilisiert) | roter Deckel |
| 1 x | Solution S (Aufnahme der lyophilisierten DNA und Herstellung v. Verd.) | grüner Deckel |

4. Lagerung

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

Die lyophilisierte Standard-DNA nicht einfrieren und bei 2 – 8 °C lagern.

Die rückgelöste Standard DNA ist bei 2 – 8 °C mindestens 2 Wochen stabil. Zur längeren Lagerung die Standard-DNAs bei -20 °C einfrieren.

Alle Reagenzien sind bei korrekter Lagerung 12 Monate haltbar

5. Zusätzlich erforderliches Material

5.1. Geräte

Real-time PCR Gerät mit den Kanälen FAM und HEX

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

Zentrifuge für Strips

Pipetten

„Vortex“

5.2. Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

sterile PCR-Reaktionsgefäße passend zum verwendeten Gerät

sterile Reaktionsgefäße 1,5 – 2,0 mL

passende, sterile Filterspitzen (Filtertips)

6. PCR

6.1. PCR-Ansatz

Vorbereitung

Vor der ersten Benutzung die Standard DNA kurz zentrifugieren und in Solution S lösen:

- die lyophilisierte Standard DNA in 100 µL Solution S aufnehmen
- 30 Minuten lösen lassen, dann gut mischen.

Herstellung einer Standardreihe z.B.:

Standard 2 wird aus Standard 1 wie folgt hergestellt: 5 µL Standard 1 + 45 µL Solution S. In dieser Verdünnung enthält Standard 2 20000 cfu / 2.5 µL.

Standard 3 wird aus Standard 2 wie folgt hergestellt: 5 µL Standard 2 + 45 µL Solution S. In dieser Verdünnung enthält Standard 3 2000 cfu / 2.5 µL.

Standard 4 wird aus Standard 3 wie folgt hergestellt: 5 µL Standard 3 + 45 µL Solution S. In dieser Verdünnung enthält Standard 4 200 cfu / 2.5 µL.

Empfehlung: Die Standards 1-4 zur längeren Lagerung bei -20 °C einfrieren.

PCR-Pipettierschema zur Herstellung der Standardreihe:

Well	Standard	Volume (µL)	Premix (µL)
1	Standard 1	2.5	17.5
2	Standard 1	2.5	17.5
3	Standard 2	2.5	17.5
4	Standard 2	2.5	17.5
5	Standard 3	2.5	17.5
6	Standard 3	2.5	17.5
7	Standard 4	2.5	17.5
8	Standard 4	2.5	17.5

Bsp: PCR-Pipettierschema zur Herstellung der Standardreihe mit direkter Quantifizierung von Proben:

Well	Standard	Volume (µL)	Premix (µL)
1	Standard 1	2.5	17.5
2	Standard 1	2.5	17.5
3	Standard 2	2.5	17.5
4	Standard 2	2.5	17.5
5	Standard 3	2.5	17.5
6	Standard 3	2.5	17.5
7	Standard 4	2.5	17.5
8	Standard 4	2.5	17.5
9	Probe x	2.5	17.5
10	Probe y	2.5	17.5
11	PTC	2.5	17.5
12	NTC	ddH ₂ O	17.5

Das PCR-Programm und die Auswertungsmodalitäten sind dem Handbuch des jeweiligen PCR-Kits zu entnehmen.

Dekkera bruxellensis Standard DNA

1. Intended use

Quantification of *Dekkera bruxellensis* in beverages (e.g. wine and grape must) by real-time PCR.

2. Test principle

The standard DNA contains 200000 cfus / 2.5 µL and is used as **Standard 1**. The **Standard 1** is prepared for using it in combination with a GEN-IAL *Dekkera bruxellensis* PCR-Kits (Q395, Q371 – Q373). For quantification the Standard 1 has to be diluted (e.g. 1:10) three times to create a standard row for determination the *Dekkera bruxellensis* amount in a sample.

The real-time PCR is based on Hotstart-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.

3. Kit contents

Standard 1 contains sufficient DNA for 40 reactions.

1 x	Standard 1 200000 cfus / 2.5 µL DNA (<i>D. bruxellensis</i> , freeze-dried)	red cap
1 x	Solution S (for solving the freeze-dried DNA and preparing dilutions)	green cap

4. Storage conditions

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

The freeze-dried Standard should be stored at 2 – 8 °C (35 – 46 °F).

Once the freeze-dried DNA is dissolved, it is stable for at least 2 weeks at 2 °C – 8 °C (35 – 46 °F).

For longer storage it is recommended to freeze the standard DNAs at -20 °C (-4 °F).

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 with the channels FAM and HEX

Centrifuge for 1.5 – 2.0 mL reaction tubes

Centrifuge for strips

Pipettes

“Vortex”

5.2. Reagents and plastic ware

sterile reaction vessels 1.5 – 2.0 mL

sterile optical tubes (plastic)

sterile filter tips

6. PCR

6.1. PCR-Setup

Preparations before first use:

*Before using the **Standard DNA** for the first time, the freeze-dried DNA has to be shortly centrifuged and carefully resolved:*

- add 100 µL sterile **Solution S** to the freeze-dried Standard DNA
- after 30 minutes mix well

Production of a standard row e.g.:

Standard 2 is produced from Standard 1 as follows: 5 µL Standard 1 + 45 µL Solution S. Thus Standard 2 has a concentration of 20000 cfu / 2.5 µL.

Standard 3 is produced from Standard 2 as follows: 5 µL Standard 2 + 45 µL Solution S. Thus Standard 3 has a concentration of 2000 cfu / 2.5 µL.

Standard 4 is produced from Standard 3 as follows: 5 µL Standard 3 + 45 µL Solution S. Thus Standard 4 has a concentration of 200 cfu / 2.5 µL.

Hint:

For longer storage it is recommended to freeze the standard DNAs at -20 °C (-4 °F).

Performing standard row:

Well	Standard	Volume (µL)	Premix (µL)
1	Standard 1	2.5	17.5
2	Standard 1	2.5	17.5
3	Standard 2	2.5	17.5
4	Standard 2	2.5	17.5
5	Standard 3	2.5	17.5
6	Standard 3	2.5	17.5
7	Standard 4	2.5	17.5
8	Standard 4	2.5	17.5

Performing standard row including samples:

Well	Standard	Volume (µL)	Premix (µL)
1	Standard 1	2.5	17.5
2	Standard 2	2.5	17.5
3	Standard 3	2.5	17.5
4	Standard 4	2.5	17.5
5	sample x	2.5	17.5
6	sample y	2.5	17.5
7	PTC	2.5	17.5
8	NTC	ddH ₂ O	17.5

The PCR-Program and Analysis mode can be taken from the instruction manuals of the corresponding PCR-Kits.