



INSTITUT FÜR ANGEWANDTE LABORANALYSEN GMBH

QuickGEN PCR Kit

Dekkera bruxellensis quantitative

- white -

Quantitativer Real-time PCR Nachweis von
Dekkera bruxellensis

Quantitative real-time PCR detection of
Dekkera bruxellensis

REF: Q373

Version 01/26

QuickGEN PCR Kit

Dekkera bruxellensis quantitativ

1. Verwendungszweck

Qualitativer und quantitativer Nachweis von *Dekkera bruxellensis* in Getränken (z.B. Wein und Most).

2. Testprinzip

Die Detektion erfolgt mittels Fluoreszenzmessung durch das Hydrolysesonden-format (TaqMan®). Durch hot-start-PCR plus einer doppelt markierten sequenzspezifischen Sonde (FAM/DQ) wird bei korrekter Hybridisierung an die Zielsequenz in der Extensions-Phase ein messbares Fluoreszenzsignal definierter Wellenlänge emittiert. Eine Inhibitionskontrolle (HEX/DQ) wird gleichzeitig 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, tubes inkl. IC-DNA)	tube strips
6 x Cap Strips	
1 x ddH ₂ O	farbloser Deckel
1 x Control-DNA (Standard 2, <i>D. bruxellensis</i> , lyophilisiert)	gelber Deckel
Standard 2 = 20000 Zellen/2,5 µL DNA	
1 x Solution S (zur Aufnahme der Control-DNA)	grüner Deckel

4. Lagerung

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

Die lyophilisierten Dye Strips und die lyophilisierte Control-DNA nicht einfrieren.

Die PCR-Reagenzien bei 2 – 8 °C lagern. Den Premix **nach Erhalt** und die gelöste Control-DNA 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 keinem unnötigen 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 passend für 1,5 – 2,0 mL Reaktionsgefäße

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

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

- die lyophilisierte Control-DNA in 55 µL Solution S aufnehmen
- 30 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	17,5
Proben-DNA	2,5
Gesamtvolumen	20,0

1. Je 17,5 µL Premix in die einzelnen PCR-Reaktionsgefäße füllen.
2. 2,5 µL Proben-DNA zu den vorbereiteten PCR Gefäßen geben, für die PCR-Positivkontrolle 2,5 µL Control-DNA, für die Extraktionskontrolle 2,5 µL und für die PCR-Negativkontrolle* 2,5 µL steriles ddH₂O dazugeben (Pipettenspitzen unbedingt nach jeder Probe wechseln).
3. Die PCR-Gefäße 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 2,5 µL ddH₂O 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	10 sec	95 °C	Cycle 40 x
Cycling Annealing/ Elongation	35 sec	63 °C	

6.2.1 Programmierung und PCR-Programm LC480:

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

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

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

2. Programm Name: **Ampli**

Cycles **40** 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	00:00:10	4.40		0	0	0
63	Single	00:00:35	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.

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

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

13. Mit der Strg Taste die entsprechenden wells im **New Subset 1 Settings** Fenster anklicken und den Button **Apply** anklicken

14. In der linken Leiste den Button **Sample editor** anklicken

15. **Ganz wichtig:** Oben in der Leiste **Step 1 Select Workflow: Abs.Quant** ankreuzen

16. In der Leiste **Step 2 Select Samples** das Subset **New Subset** auswählen

17. Proben in der Tabelle eingeben

18. In der linken Leiste den Button **Experiment** anklicken und mit **Start run** den Lauf starten

7. Auswertung

A. qualitativ

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

Für LC480: Vor der Auswertung die Colour Compensation aktivieren

***Dekkera bruxellensis*-DNA:** FAM-Kanal (LC480: 465-510)

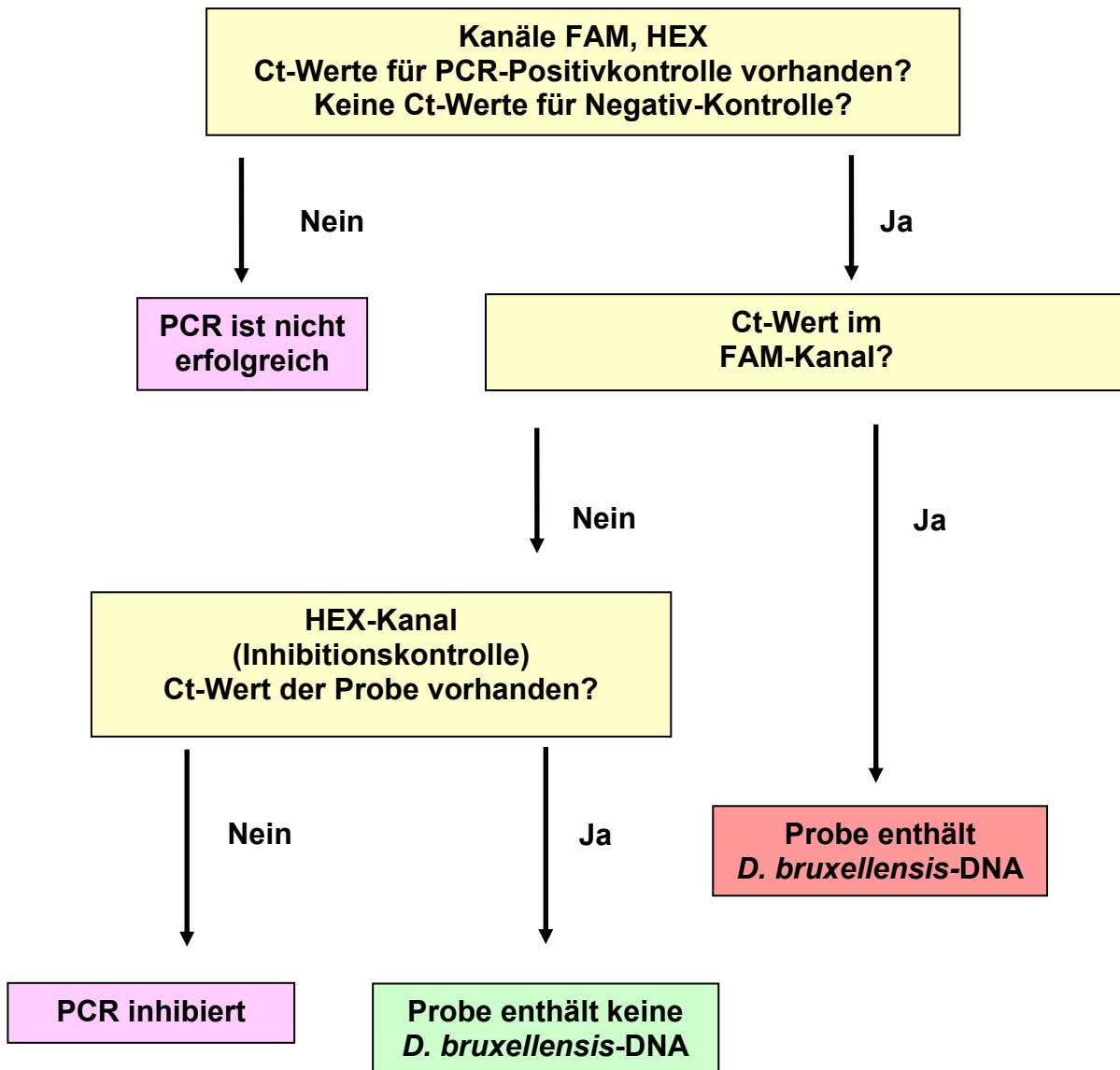
Inhibitionskontroll-DNA: HEX-Kanal (LC480: 533-580)

Eine Probe wird als ***Dekkera bruxellensis*** 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 HEX-Kanal kann im Probenansatz positiv oder negativ sein, abhängig von der DNA-Menge oder Inhibitoren im Reaktionsansatz. In den Negativkontrollen muss sie positiv sein.

Eine Probe wird als negativ bewertet, wenn der Ansatz der Probe im FAM-Kanal negativ ist und die PCR-Positivkontrolle gleichzeitig positiv ist. Die PCR-Negativkontrolle muss im FAM-Kanal negativ sein. Die Inhibitionskontrolle im HEX-Kanal muss im Probenansatz positiv sein, um ein falsch negatives Ergebnis durch inhibitorische Effekte auszuschließen.

Analysediagramm

LC480: Auswertung nach ausgewählter Colour Compensation



B. quantitativ

Die quantitative Auswertung wird entsprechend der für das real-time PCR-Gerät verwendeten Software durchgeführt (s. Herstellerangaben). Falls die automatische Datenanalyse nicht ausreichend ist, kann die *threshold* manuell bis zu einer optimalen Effizienz verschoben werden.

In einer quantitativen real-time PCR sollten die ct-Werte mit zunehmender DNA-Menge linear abnehmen. Die gerätespezifische Software kalkuliert die Standardkurve und deren Steigung anhand der eingegebenen DNA Konzentrationen und zugehörigen gemessenen ct-Werte. Die Standardreihe sollte einen Fehler $< 0,1$ haben und eine möglichst optimale PCR-Effizienz. Die Differenz der ct-Werte der Standardverdünnungen 1:10 sollte ungefähr bei 3,3 liegen. Stimmen die ct-Werte der PTC mit dem ct-Wert des Standards 2 der Standardreihe überein? Abweichungen von ca. 0.5 ct nach oben oder unten sind akzeptabel. Bei größeren Abweichungen neu pipettieren. Die ct-Werte der Proben werden automatisch mit der Standardkurve verglichen und die DNA-Konzentrationen berechnet. Zur exakten Quantifizierung sollten die ct-Werte der Proben-DNAs im Bereich der ct-Werte der Standardreihe liegen.

Zur Berechnung der *Dekkera bruxellensis* Konzentration pro mL Probe werden die gemessenen Werte der Probe mit 40 multipliziert. Dieser Faktor berechnet sich aus dem vorliegenden DNA-Volumen von 100 μL nach der DNA-Isolation (Q300) und den davon pipettierten 2,5 μL .

Beispiel:

Gemessener Wert von $4,61\text{E}+03 = 4610 \times 40 = 1,8 \times 10^5 \text{ cfu / mL Probe}$

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

Dekkera bruxellensis quantitative

1. Intended use

Qualitative and quantitative detection of *Dekkera bruxellensis* 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) 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 (HEX/DQ) is amplified together in one reaction vessel with the specific sequence.

3. Kit contents

The kit contains sufficient reagents for 48 reactions:

1 x Premix	white cap
6 x Dye Strips (freeze-dried, tubes incl. IC-DNA)	tube strips
6 x Cap Strips	
1 x ddH ₂ O	colourless cap
1 x Control-DNA (Standard 2, <i>D. bruxellensis</i> , freeze-dried)	yellow cap
Standard 2 = 20000 cells/2,5 µL DNA	
1 x Solution S (for solving Control-DNA)	green cap

4. Storage conditions

The Control-DNA is freeze-dried, it 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 machine for white PCR tubes

Centrifuge for 1.5 – 2.0 mL reaction tubes

Centrifuge for strips

Pipettes

“Vortex”

5.2. Reagents and plastic ware

sterile ddH₂O

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 in Solution S

- add 55 µL Solution S to the freeze-dried Control-DNA
- after 30 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	amount (µL)
Premix	17.5
Sample-DNA	2.5
Total volume	20.0

1. Pipette 17.5 µL of the Premix into each PCR-tube, making sure that, prior to the first filling, the tip of the pipette has been moistened.
2. Add 2.5 µL sample DNA, add 2.5 µL of the Control-DNA for the PCR positive control, add 2.5 µL of the extraction control and 2.5 µL of ddH₂O 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 2.5 µL ddH₂O 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	10 sec	95 °C	Cycle 40 x
Cycling Annealing/ Elongation	35 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
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

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

4. Programm Name: **Ampli**

Cycles **40** 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	00:00:10	4.40		0	0	0
63	Single	00:00:35	2.20		0	0	0

5. 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

* for preenriched samples program 30 cycles

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

A. qualitative

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

For LC480: For analysis activate Colour Compensation

***Dekkera bruxellensis*-DNA:** FAM-channel (LC480: 465-510)

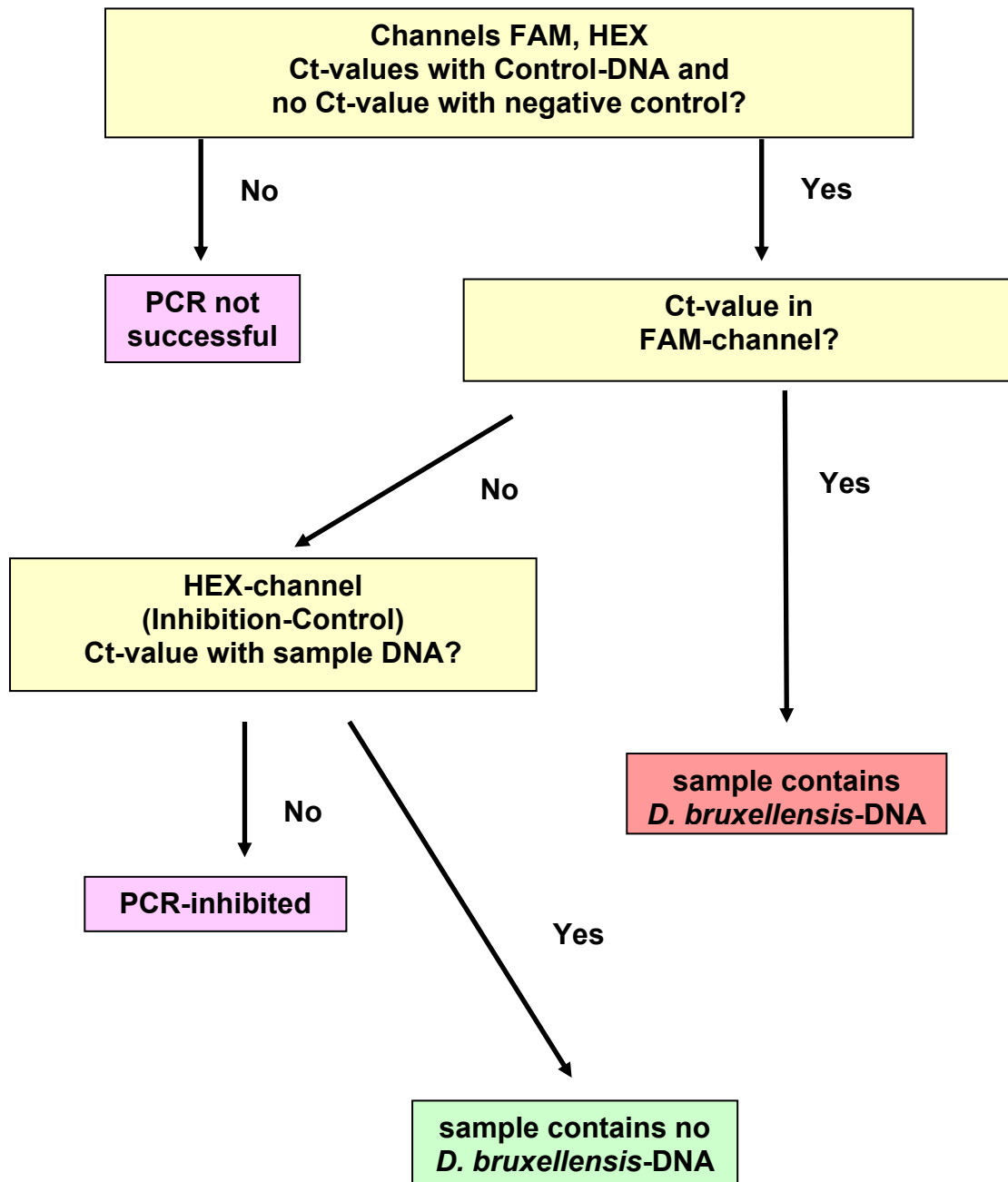
Inhibition Control-DNA: HEX-channel (LC480: 533-588)

A sample is ***Dekkera bruxellensis* 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 HEX-channel may be positive or negative (depending on the amount of DNA or inhibitors in the sample reaction). For negative controls it has to be positive.

A sample is **negative**, if there is no detectable fluorescence increase in FAM-channel and the positive controls have a positive fluorescence signal. The negative controls show no amplification in FAM-channel. The Inhibition Control in HEX-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

LC480: analysis after activating Colour Compensation



B. quantitative

Quantitative data analysis has to be made according to the data analysis program recommended by the real-time instrument manufacturer. For insufficient results with automatic data analysis, adjust the threshold manually to an optimal efficiency.

In a quantitative real-time PCR assay the ct-values should decrease linearly with ascending DNA concentration per reaction. The software provided with the real-time PCR machine calculates standard curve and slope using the DNA-concentrations stated by the user and the appendant ct-values. The standard row should have an error < 0.1 and an optimal PCR efficiency. The difference between the ct-values of the standard dilutions (at a ratio of 1:10) should be approximately 3.3. Fits the ct-value of the PTC to the ct-value of standard 2 of the standard row? Deviations of 0.5 ct up or down are acceptable. If not, repeat pipetting. The ct-values of the samples with unknown DNA concentrations are now automatically compared to the standard curve and concentrations are assigned.

For accurate quantification, the ct-values of the sample DNA should, as much as possible, lie within the range of the crossing points of the standard series.

For quantification of *Dekkera bruxellensis* concentration per mL sample, the measured values for the samples have to be multiplied with the factor 40. The factor is calculated from the DNA volume of 100 µL after DNA isolation (Q300) and pipetting of 2.5 µL.

Example:

measured value of $4.61\text{E}+03 = 4610 \times 40 = 1.8 \times 10^5$ cfu / mL sam

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.